

**Etablierung eines neuen Polyacrylamid-Gelsystems zur
verbesserten massenspektrometrischen Analyse von Proteinen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Sandra Bornemann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2010)
(D30)

vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Herr Prof. Dr. Michael Karas

Herr Prof. Dr. Hermann Schägger

Datum der Disputation: 13.07.2010

Für meine Eltern

I've not failed.
I've just found 10.000 ways that won't work.

Thomas Alva Edison

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	16
1. Einleitung.....	19
1.1 Proteinanalytik.....	19
1.1.1 <i>Proteomics</i> -Methoden	21
1.1.2 Nicht-gelbasierte Separationsmethoden	23
1.1.3 Gelbasierte Trennmethode n	24
1.1.4 Visualisierungsmethoden	32
1.1.5 Proteolyse	34
1.1.6 Proteolytischer Verdau im Gel	35
1.2 Membranproteine	37
1.3 Massenspektrometrie zur Proteinanalyse	42
1.3.1 Allgemeine Ionisierungsmethoden.....	44
1.3.2 ESI.....	45
1.3.3 MALDI.....	46
1.3.4 Massenanalysatoren	49
1.3.5 <i>Peptide mass fingerprinting</i> (PMF).....	53
1.3.6 Fragmentierungstechniken	55
1.4 Quantifizierungstechniken.....	60
2. Zielsetzung.....	63

3.	Material und Methoden	67
3.1	Materialien	67
3.2	Probenvorbereitung.....	70
3.2.1	Standardproteine, d2Ant-Komplex und Purpurmembran	70
3.2.2	Cytosolische Extrakte von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	70
3.2.3	Komplex I aus <i>Aquifex aeolicus</i>	71
3.2.4	Proteingrößenmarker	71
3.3	SDS-PAGE	72
3.4	2D-IEF/SDS-PAGE	77
3.5	Färbemethoden	79
3.5.1	Silberfärbung.....	79
3.5.2	Kolloidale CBB-Färbung	79
3.5.3	EZ-Färbung.....	80
3.5.4	RuBPS-Färbung	80
3.5.5	Lumitein TM -Färbung.....	80
3.6	Western Blot.....	81
3.7	Proteolytischer Verdau im Gel.....	81
3.8	Massenspektrometrische Untersuchungen mittels MALDI	83
3.8.1	Probenvorbereitung	83
3.8.2	Präparation	83
3.8.3	MALDI Massenspektrometrie.....	83
3.8.4	Datenauswertung	84
4.	Ergebnisse.....	87
4.1	NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (<i>Aquifex aeolicus</i>)	87
4.1.1	Untersuchung der Untereinheiten nach der Standardaufreinigung	88
4.1.2	Untersuchung der Untereinheiten nach modifizierter Aufreinigung.....	95

4.2	Entwicklung eines Gelsystems mit erweiterbarer Porengröße	100
4.2.1	Herstellung, Aussehen, physikalische und Laufeigenschaften	100
4.2.2	Visualisierung von Proteinen im neuen Gelsystem.....	103
4.2.3	MALDI-MS nach der Esterhydrolyse durch Natronlauge	107
4.2.4	Tris-Glycin MBA/EDA-Gele mit T= 14% und C= 2,6%	109
4.2.5	Ammoniak-Inkubation	110
4.2.6	Kolloidale CBB-Färbung in der Mikrowelle	112
4.2.7	Tris-Glycin MBA/EDA-Gele mit T= 14% und C= 4%	114
4.2.8	Variationen der Ammoniak-Menge und der Größe der Gelstücke	116
4.2.9	Tris-Glycin MBA/EDA-Gele mit T= 16% und C= 5%	117
4.2.10	Tris-Tricin MBA/EDA-Gele mit T= 16,5% und C= 6%	121
4.2.11	Tris-Glycin EDA-Gele: Vorteile der starken Quellung?.....	122
4.2.12	PMF-Ergebnis nach Lumitein-Färbung	124
4.2.13	Adaptierte Gele mit gemischten <i>Crosslinkern</i>	127
4.2.14	In-Gel Verdau mit der weniger spezifischen Protease Elastase	133
4.2.15	Verdau mit der weniger spezifischen Protease Pepsin.....	135
4.2.16	Western Blot.....	140
4.2.17	RuBPS-Färbung	141
4.2.18	MS- und MS/MS-Ergebnisse nach IEF/SDS-PAGE mit ad. 2D-Gelen.....	142
5.	Diskussion.....	149
5.1	<i>Aquifex aeolicus</i>.....	149
5.2	Gele mit gemischten Quervernetzern (MBA/EDA).....	154
5.2.1	Einleitung	154
5.2.2	Wahl eines geeigneten <i>Crosslinkers</i> und dessen Spaltung.....	155
5.2.3	Kompatibilität.....	158
5.2.4	In-Gel-Verdau	160
5.2.5	Massenspektrometrische Analyse.....	160
5.2.6	2D-PAGE	165

5.2.7	In-Gel Verdau mit Elastase und Pepsin.....	166
5.2.8	Ausblick	170
6.	Zusammenfassung	171
7.	Referenzen	173
8.	Abkürzungsverzeichnis	185
9.	Anhang	189
9.1	Komplex I	189
9.1.1	Homologie der einzelnen Untereinheiten.....	189
9.1.2	Trypsinschnittstellen und Transmembranhelices	195
9.2	Gele mit MBA und EDA als Quervernetzer	202
9.3	2D-Experimente	211
10.	Publikationsliste	219
	Lebenslauf	221
	Danksagung.....	223

Abbildungsverzeichnis

1.1	Vergleich klassischer Proteinbiochemie mit MS-basierter <i>Proteomics</i>	20
1.2	Spaltbare Quervernetzer.....	25
1.3	Schematische Darstellung der diskontinuierlichen Gelelektrophorese.....	27
1.4	Schematische Darstellung einer IEF.....	31
1.5	Darstellung der Atmungskette	38
1.6	Strukturen der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase unterschiedlicher Spezies.....	39
1.7	Schematische Darstellung des Proteins Bacteriorhodopsin.....	41
1.8	Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers	43
1.9	Darstellung eines TOF-Massenanalysators	51
1.10	Schematische Darstellung des 4800 TOF/TOF™ Analyzers	57
1.11	Nomenklatur von MS/MS-Fragmenten nach Roepstorff.....	58
2.1	Monomere zur Herstellung eines Polyacrylamidgels	63
2.2	Skizzierung der basischen Hydrolyse eines Gels mit gemischten <i>Crosslinkern</i> ...	65
3.1	Verwendung des Mini Protean 3-Systems	75
3.2	Vergleich zwischen Cup- und Rehydrationloading (Beispiel)	77
4.1	Auftrennung des Komplex I von <i>A. aeolicus</i> per SDS-PAGE.....	88
4.2	Fragmentspektren von Peptiden hydrophober Untereinheiten	93
4.3	Fragmentspektren von Peptiden der Isoformen Nuo D1 und D2	94
4.4	Auftrennung der Untereinheiten des Komplex I nach modifizierter Reinigung....	95
4.5	Fragmentspektren hydrophober Untereinheiten in der Standardaufreinigung.....	98
4.6	Quellverhalten eines Gels mit EDA als Quervernetzer	100
4.7	Laufverhalten in Tris-Glycin Gelen mit untersch. MBA/EDA-Verhältnissen	101
4.8	Laufverhalten in Tris-Tricin Gelen mit untersch. MBA/EDA-Verhältnissen	102

4.9	Sensitivitätstest einer kolloidalen CBB-Färbung.....	104
4.10	Sensitivitätstest für die Farbstoffe EZ und RuBPS.....	105
4.11	Verdünnungsreihe einer Mischung aus Standardproteinen, Lumitein.....	106
4.12	MALDI-Spektren nach EDA-Hydrolyse durch Natronlaugezugabe.....	108
4.13	Identifizierte Peptide aus Gelen mit untersch. MBA/EDA-Verhältnissen	110
4.14	identifizierte Peptide nach unterschiedlich langer Ammoniakinkubation	112
4.15	Kolloidale CBB-Färbung in der Mikrowelle	113
4.16	PMF-Ergebnisse für gemischte Gele mit MBA/EDA 3	115
4.17	Modifikation des Verdauprotokolls und der Gelgröße	116
4.18	PMF-Ergebnisse für Gele mit dichteren Gelporen	118
4.19	PMF-Ergebnisse für Untersuchung des d2Ant-Komplexes.....	121
4.20	PMF-Ergebnisse für in-Gel Verdau in reinen EDA- Gelen.....	123
4.21	Vergleich der PMF-Resultate von Lumitein- und CBB-gefärbten Gele	125
4.22	Spektren von einer Lumitein- und einer kolloidalen CBB-gefärbten Probe.....	126
4.23	Laufverhalten von Proteinen im ad. Tris-Glycin MBA/EDA-Gelsystem	127
4.24	Laufverhalten von Proteinen im ad. Tris-Tricin MBA/EDA-Gelsystem.....	128
4.25	PMF-Vergleich zwischen MBA- und adaptierten MBA/EDA-Gelen	129
4.26	Vergleich der MS-Spektren einer BSA-Probe	130
4.27	Vergleich der MS-Spektren einer Amylase-Probe	131
4.28	Vergleich kleiner Proteinmengen zw. Standard- und ad. MBA/EDA-Gel.....	132
4.29	Elastaseverdau in Standard- und adaptiertem MBA/EDA-Gel	133
4.30	BR-Spektren von Standard- und adaptiertem MBA/EDA-Gel.....	134
4.31	Schnittspezifität von Pepsin.....	135
4.32	Fragmentspektrum eines durch Pepsin entstandenen Amylase-Peptids	136
4.33	Auswertung der peptischen Proteolyse von Amylase.....	136
4.34	Identifizierte Peptide beim MBA/EDA 0,5-Gelsystem	138
4.35	Durch Pepsin generierte Amylase-Spektren der unterschiedlichen Gelsysteme	139

4.36	Immunblot eines 293T-Lysats und eines ENL-Strep-Fusionproteins	140
4.37	PMF-Vergleich von RuBPS-gefärbten Standard- und Mischgelen	141
4.38	Vergleich zwischen Probe und deren Präzipitat in versch. Konzentrationen	143
4.39	2D-Gel einer cytosolischen <i>C. glutamicum</i> -Probe	144
4.40	Analysierte Proteinspots der cytosolischen <i>C. glutamicum</i> -Probe	145
5.1	Mögliche Porenstruktur eines MBA/EDA-Gels	157
5.2	Tryptophanoxidationen	164
5.3	Pepsin-Proteolyse von Myoglobin	169
9.1	Gelbild über den pH-Bereich 3-5,6 des cytos. <i>C. glutamicum</i> -Extrakts.....	214

Tabellenverzeichnis

3.1	Kommerziell erhältliche Reagenzien	67
3.2	Matrix, Proteine, Enzyme und Standards	68
3.3	Verbrauchsmaterialien	69
3.4	Verwendete Geräte und Software	69
3.5	Verwendete Puffer für die Protein-Trennung mit Tris-Glycin Gelen.....	72
3.6	Verwendete Puffer für die Protein-Trennung mit Tris-Tricin Gelen.....	72
3.7	Mengenangaben für zwei Tris-Glycin Trenngele (15 ml, Minigel-Ansatz)	73
3.8	Mengenangaben für zwei Tris-Glycin Sammelgele (10 ml, Minigel-Ansatz)	73
3.9	Mengenangaben für zwei Tris-Tricin Trenngele (20 ml, Minigel-Ansatz)	73
3.10	Mengenangaben für zwei Tris-Tricin Sammelgele (10 ml, Minigel-Ansatz).....	74
3.11	Protokoll für den proteolytischen Verdau im Gel.....	82
4.1	Untereinheiten und potentielle Isoformen des Komplex I.....	87
4.2	Mittels PMF ident. Proteine in der Standardaufreinigung von Komplex I.....	89
4.3	MS/MS-verifizierte Identifizierung der Untereinheiten von Komplex I	91
4.4	Proteinidentifikation nach Standard- und mod. Aufreinigung vom Komplex I	96
4.5	MS/MS-Daten hydrophober Untereinheiten nach der Standardaufreinigung	99
4.6	Per MALDI-MS ermittelte Peptidanzahlen für untersch. Hydrolysezeiten.....	111
4.7	Peptidanzahl nach PMF-Suche bei erhöhtem C%-Wert.....	114
4.8	PMF-Ergebnisse für Gele mit dichteren Gelporen I	119
4.9	PMF-Ergebnisse für Gele mit dichteren Gelporen II.....	120
4.10	PMF-Ergebnisse für in-Gel Verdau aus puren EDA-Gelen	122
4.11A	PMF-Ergebnisse Lumitein-gefärbter Gele.....	124
4.11B	PMF-Ergebnisse kolloidal CBB-gefärbter Gele	125
4.12	Aus 32 Gelspots identifizierte Proteine der cytos. <i>C. glutamicum</i> -Probe.....	146

4.13	PMF-Ergebnisse der Gele im Vergleich	147
9.1	Peptidliste ADH	202
9.2	Peptidliste Amylase	203
9.3	Peptidliste BSA	205
9.4	Peptidliste CAH	207
9.5	Peptidliste Serotransferrin	208
9.6	Peptidliste BR	210
9.7	MS/MS-Daten der 2D-Gele über den pH-Bereich 4-7 im Vergleich	211
9.8	Proteinliste über den pH-Bereich 3-5,6 des cytos. <i>C. glutamicum</i> -Extrakts	215

1. Einleitung

1.1 Proteinanalytik

Anfang der 1990er Jahre wurde das Human-Genom-Projekt (HGP) ins Leben gerufen, um das komplette Genom des Menschen zu charakterisieren. Man ging davon aus, dass mit Hilfe dieser Informationen die klassische biochemische Forschung erleichtert und verbessert werden würde. Das HGP wie auch Genomsequenzierungsprogramme anderer Spezies wurden erfolgreich abgeschlossen [Lander 2001; Venter 2001; Deckert 1998; Gibbs 2004] und lieferten durch die Aufklärung des genetischen Codes die Grundlage zur Bestimmung der Aminosäureabfolge für jedes Protein des Organismus [Rowen 1997; Fraser 1997]. Die Entschlüsselung des Genoms hatte die Entstehung des neuen Forschungsgebiets *Proteomics* zur Folge [Aebersold 2000; Pandey 2000; Goffeau 1996]. Der Begriff „Proteom“, der sich aus den Worten Protein und Genom ableitet, definiert die Gesamtheit der durch ein Genom exprimierten Proteine. Diese Definition wird dem hoch dynamischen Proteom jedoch nicht gerecht. So kann die Proteinexpression unter anderem durch Temperaturschwankungen, Stress in der Zelle oder alternatives Spleißen von Genen beeinflusst werden. Auch die Art und Anzahl an posttranslationalen Modifikationen (PTMs) wie Phosphorylierungen oder Glykosylierungen wird durch äußere Faktoren und den physiologischen Zustand der Zelle reglementiert. Folglich ist die Beschreibung des Proteoms als das gesamte Vorkommen an Proteinen, die von einem Genom, einer Zelle, einem Gewebe oder Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen exprimiert werden, sinnvoller [Wilkins 1996; Wasinger 1995; Hochstrasser 1998]. Als *Proteomics* kann somit die systematische Analyse eines Proteoms bezeichnet werden, um zelluläre Zustände und deren molekulare Mechanismen zu studieren [Haynes 1998], aber auch die umfangreiche Untersuchung von Proteinen in biologischen Proben im Allgemeinen.

Der klassische biochemische Ansatz zur Untersuchung biologischer Vorgänge basiert auf der Analyse der strukturellen, funktionellen und regulierenden Aufgabe jeder einzelnen Komponente und der Zusammensetzung dieser einzelnen Ergebnisse zur Bestimmung von Interaktionen (Abb. 1.1) [Aebersold 2001]. Der MS-basierte *Proteomics*-Ansatz hat gegenüber dieser klassischen Methode Vorteile, z.B. können tausende Proteine gleichzeitig analysiert werden. Auch die höhere Sensitivität dieser *Proteomics*-Technologie ist

durchaus Gewinn bringend, da die Probenmengen zur Analyse oft limitiert sind. Außerdem muss die Untersuchung nicht auf einen bestimmten biologischen Prozess wie z.B. einen spezifischen Signalübertragungsweg festgelegt werden. So können auch solche Proteine identifiziert werden, die vorher nur hypothetisch über ihre translatierte Aminosäuresequenz bekannt waren. Dies ermöglicht die Analyse unter einem nicht festgelegten Blickwinkel und somit auch die Entdeckung neuer molekularer Mechanismen [Vercauteren 2007]. Mit einem *Proteomics*-Experiment kann durch die Untersuchung von lediglich einer Probe ein Überblick über das Expressionsprofil von dutzenden Proteinen erhalten werden [Washburn 2001; Kislinger 2006]. Da Proteine in vielen klinischen Bereichen wie Krebsvorsorge, Toxikologie, Diagnosestellungen etc. eine Rolle spielen, nimmt das Feld der *Proteomics* einen zunehmend wichtigeren Teil der medizinischen Forschung ein [Capelo 2009]. So kann beispielsweise ein quantitativer Vergleich von Proteinen in krankem und gesundem Gewebe vorgenommen werden, um neue *Biomarker* zu finden [Fu 2006].

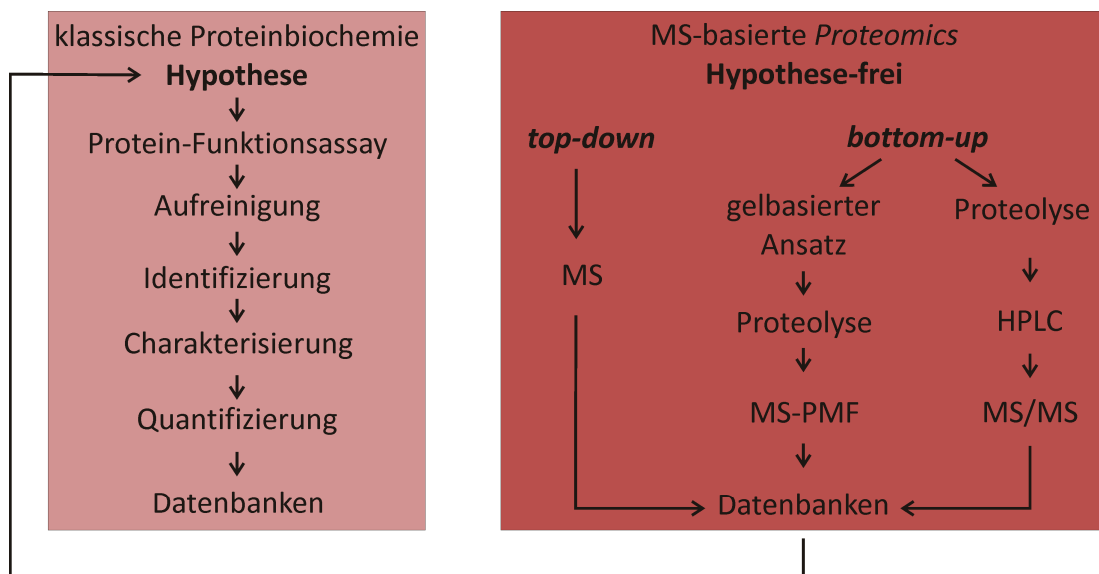


Abb. 1.1 Vergleich klassischer Proteinbiochemie mit MS-basierter Proteomics

Links die Vorgehensweise bei der klassischen biochemischen Forschung, rechts die Arbeitsabläufe bei MS-basierten *Proteomics*-Experimenten, unterteilt in *Top-down* und *Bottom-up*-Analyse (modifiziert nach Jungblut 2008)

Es ist immer noch eine Herausforderung Strukturen, Interaktionen und Funktionen aller Proteine einer Zelle zum Zeitpunkt eines bestimmten Entwicklungsstatus zu charakterisieren. Biologische Proben enthalten oft viele Proteine, die in unterschiedlichen Zuständen vorliegen, d.h. die Art und der Grad der PTMs eines Proteins können je nach Kompartiment stark variieren. Ein noch größeres Problem stellt jedoch der hohe dynamische Bereich einer komplexen Proteinprobe dar. Zum Beispiel deckt der dynamische Bereich der Proteine einer prokaryontischen Probe vier Zehnerpotenzen, der einer eukaryontischen Zelle sechs Zehnerpotenzen und der in komplexen biologischen Flüssigkeiten wie Plasma sogar zwölf Zehnerpotenzen ab [Anderson 2002; Lu 2007]. Ist das Verhältnis zwischen vereinzelt vorkommenden Analyten und den sehr reichlich vorhandenen Vertretern, wie beispielsweise Albumin oder Immunglobulin G (IgG) im Blut, sehr groß, können Schwierigkeiten bei der Identifizierung der weniger abundanten Proteine auftreten.

1.1.1 *Proteomics-Methoden*

Das Forschungsfeld der *Proteomics* setzt sich aus vielen verschiedenen Techniken zusammen. Da jede einzelne Methode Vor- als auch Nachteile aufweist, muss der verwendete Ansatz auf die biologische oder experimentelle Fragestellung wie Proteomcharakterisierung, Identifizierung und Lokalisierung von PTMs oder Protein-Protein-Interaktionen [Mann 2003; Florens 2006] abgestimmt werden. So können Protein-*Microarrays* angewendet werden, um einen Überblick über die Proteinexpression zu erhalten oder quantitative Vergleichsstudien durchzuführen [Melton 2004; Ren 2006]. Das Hefe-2-Hybrid-System, reverse 2-Hybrid-Assays [Uetz 2000; Vidal 1999] oder *Phage-Display* [Sidhu 2003] werden zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen herangezogen.

Der Ablauf eines MS-basierten *Proteomics*-Experiments kann im Allgemeinen in drei Teile gegliedert werden: die Auftrennung eines Protein- oder Peptidgemischs zur Reduzierung der Probenkomplexität, die durch massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführte Identifikation und die sich daran anschließende bioinformatische Datenanalyse. Der zweite Punkt, der massenspektrometrische Nachweis von Proteinen, kann über zwei Wege erreicht werden: über die *Top-down*- oder die *Bottom-up*-Strategie (Abb. 1.1).

Als *Top-down-Proteomics* wird die Analytik von intakten Proteinen bezeichnet. Ganze Proteine werden in der Gasphase ionisiert und in hochauflösenden Massenspektrometern gemessen. Dieser Prozess wird oft durch direkte Fragmentierung des Proteins unterstützt [McLafferty 2007]. Der *Top-down*-Ansatz bietet die Möglichkeit, die komplette Aminosäuresequenz zu betrachten und erlaubt eine bessere Charakterisierung von Isoformen und PTMs, da der Unterschied zwischen gemessener und durch die DNA-Sequenz bestimmter theoretischer Masse einen direkten Rückschluss auf eine Modifikation ermöglicht. So haben *Top-down*-Messungen das Potential, schwierige biologische Fragestellungen wie die Charakterisierung von kombinierten Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen zu lösen [Siuti 2007; Garcia 2007]. Ein Nachteil dieser Anwendung ist jedoch, dass Proteine >50 kDa nicht analysiert werden können, da mit zunehmender Größe die Komplexität der Tertiärstruktur in der Gasphase durch nichtkovalente Interaktionen zunimmt. Außerdem werden die Experimente meist nur mit einem Protein oder einer einfachen Mischung durchgeführt, da eine großangelegte Proteomanalyse noch eine erhebliche Herausforderung darstellt [Han 2008].

Die *Bottom-up*-Strategie ist die Standardanwendung bei MS-basierten *Proteomics*-Experimenten, vor allem bei der Hochdurchsatzanalyse von komplexen Proben. Bei diesem Ansatz werden die Proteine chemisch oder mit Hilfe eines Enzyms in Peptide gespalten. Sie werden danach mittels Massenspektrometrie analysiert und zur Proteinidentifizierung und -charakterisierung herangezogen. Diese Abläufe werden später im Detail erläutert (Kap. 1.1.5 ff).

Die Vortrennung von Peptiden und Proteinen ist ein entscheidender Schlüsselschritt für die erfolgreiche *Top-down*- oder *Bottom-up*-Analyse. Trennungsstrategien beinhalten meist die Kombination mehrerer Methoden und können sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene erfolgen. Da meist experimentelle Großansätze durchgeführt werden, müssen die Trennmethoden großflächig und allgemein anwendbar sein. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass jeder zusätzliche Aufreinigungsschritt einen Proteinverlust [Yocum 2005] oder Modifikationen zur Folge haben kann. Aus diesem Grund ist es wichtig, für jede Analyse einen Kompromiss zwischen guter Probenaufreinigung und dem Erhalt an ursprünglicher Information zu finden.

1.1.2 Nicht-gelbasierte Separationsmethoden

Das Mittel der Wahl bei nicht-gelbasierten Trennmethoden ist die Flüssigchromatographie, bei der die Trennung durch Wechselwirkungen der Probe mit einer stationären und einer mobilen Phase erfolgt. Dieser Ansatz ist schon seit 1960 bekannt, als Moore und Lee hydrophile Leberproteine über Ionenaustauschchromatographie auf einer DEAE-Säule getrennt haben [Moore 1960]. Durch Variation der stationären oder mobilen Phase kann diese Technik an die Anforderungen der Probe angepasst werden. Am häufigsten wird über eine *Reversed phase* (RP)-HPLC getrennt. Die Probe geht hydrophobe Wechselwirkungen mit einer meist aus C18-Material bestehenden stationären Phase ein. Eine hochauflösendere chromatographische Fraktionierung wird nun durch Einsatz eines Gradienten erreicht, so dass durch die Änderung des organischen Anteils in der mobilen Phase Proteine oder Peptide zu unterschiedlichen Zeitpunkten eluieren [Covey 1991; Hunt 1992]. Das RP-Material ist beliebt, da die Trennung effizient und reproduzierbar ist und die verwendeten Fließmittel ESI-kompatibel sind [Shen 2002]. Aus diesem Grund wird RP-Harz als Einzelphase und nahezu immer als letzte Phase einer multidimensionalen Trennung verwendet [Link 1999; Opiteck 1997]. Meist folgt eine Kopplung an Geräte mit einer ESI-Quelle, so dass diese Trennung als Standardanwendung vieler LC/MS Versuche gilt [Fournier 2007].

Andere HPLC-Trennungen basieren auf der Adsorption an Silicaoberflächen (Normalphasen-HPLC) oder auf Größenausschluss durch eine stationäre Phase mit einer einheitlichen Porengröße. Die Affinitätschromatographie, die sich spezielle biomolekulare Interaktionen zu Nutze macht [Issaq 2005], wird häufig bei Serumproteinstudien eingesetzt, um hochabundante Proteine wie Albumin oder IgG abzureichern [Fountoulakis 2004; Righetti 2006]. Desweiteren kann auch mittels Tandem-Affinitäts-Aufreinigung eine Trennung durchgeführt werden. In der Regel werden mit dieser Methode Proteinkomplexe separiert [Rigaut 1999; Puig 2001]. Heutzutage werden mehrere der oben genannten Techniken für sehr komplexe Proben kombiniert und eine zwei- oder dreidimensionale Trennung durchgeführt. Als Beispiel soll hier die MudPIT-Methode (*multidimensional protein identification technology*) genannt werden. Ein starker Kationenaustauscher und RP18-Material werden in einer Säule kombiniert und die Fraktionen *online* mit einem ESI-Instrument gemessen, um anschließend die Peptide mittels Fragmentierungstechnik zu identifizieren [Wolters 2001].

Weitere nicht-gelbasierte Techniken zur Fraktionierung von Proteinen oder Peptiden sind lösungsbasierte isoelektrische Fokussierungen (CIEF, FFE, OGE), bei denen die Auftrennung über die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (pI) der Analyten erfolgt. Die Separation in flüssigem Medium kann über ein System mit mehreren Kammern, mit freier Strömung in einer Kammer, in einer Kapillare oder in Kammern über einem Gelstreifen erfolgen [Righetti 2005a; Moritz 2005; Wang 2007; Ros 2002].

1.1.3 Gelbasierte Trennmethode

Neben den chromatographischen Methoden ist die Gelelektrophorese immer noch die am häufigsten angewandte hochauflösende Separationstechnik im *Proteomics*-Bereich [Görg 2009]. Zwei Arten der Gelelektrophorese bilden hier die Schwerpunkte: die Zonenelektrophorese und die isoelektrische Fokussierung.

Die erste Elektrophorese wurde von Arne Tiselius durchgeführt, der 1937 eine Publikation über MBE (*moving boundary electrophoresis*) veröffentlichte. Bei der Grenzflächen-Elektrophorese wandern geladene Partikel unter dem Einfluss eines elektrischen Felds durch eine flüssige stationäre Phase und werden mittels Schlierenoptik detektiert [Tiselius 1937]. Hiermit konnte zwar die Mobilität von Proteinen untersucht, aber keine komplette Trennung der einzelnen Probenbestandteile in so genannte Zonen erzielt werden. Aus dieser Idee entwickelte sich dann die Zonenelektrophorese, bei der mit Hilfe eines Trägermediums unter konstantem pH-Wert Analyten mit einer Nettoladung durch ein elektrisches Feld in Banden aufgetrennt werden. Die Trägermedien wirken Konvektion und Sedimentation entgegen [Righetti 1989]. Nach Papier [von Klobusitzky 1939; Wieland 1948] wurden in den 1950er Jahren u.a. Agar, Pektin und Alginat als Träger verwendet, konnten sich jedoch nicht durchsetzen [Grabar 1953; 1956]. Stärke-Gele ermöglichten durch einen größeren molekularen Siebeffekt eine gute elektrophoretische Trennung [Smithies 1955], hatten jedoch den Nachteil hochgradiger Elektroosmose und Opazität des Gels. Nur drei Gelmatrices sind bis heute in Gebrauch: Celluloseacetat, Agarose und Polyacrylamid [Kohn 1957; Hjerten 1961; Raymond 1959]. Mit Hilfe von Celluloseacetat können Proteine innerhalb von 20 min aufgetrennt werden [Righetti 1989]. Ein Gelfilm der Substanz erlaubt die Trennung großer Serumproteine und kann zur direkten Immunfixation ohne vorherigen Transfer durch *Blotting* eingesetzt werden [Cawley 1976; Keshgegian 1981]. Agarose wird in der Regel zur Auftrennung von

Nukleinsäurefragmenten verwendet [Stellwagen 2009]. Die größte Bedeutung in der Proteinanalytik haben Polyacrylamidgele, die sich aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften durchgesetzt haben. Sie sind optisch und ultraviolett transparent, neigen nicht zu Elektroendosmose und gehen keine Wechselwirkungen mit den zu trennenden Polyionen ein, da sie chemisch inert sind. Außerdem können sie mit verschiedenen Porengrößen angefertigt werden [Righetti 1981]. Zur Herstellung wird der Hauptbestandteil Acrylamid, katalysiert durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin (TEMED), radikalisch zu langen linearen Filamenten polymerisiert. Durch chemische Kopolymerisation mit dem Quervernetzer N,N' -Methylenbisacrylamid (MBA) werden die Filamente zu einem dreidimensionalen Netzwerk verbunden. Außer dem als Standard genutzten MBA, gibt es noch weitere *Crosslinker*, die zur Herstellung von Polyacrylamidgelen eingesetzt werden können. Einige von ihnen sind chemisch spaltbar. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt, um wiederauflösbare Gele herstellen zu können. Auf der Grundlage des chemischen Prinzips der Spaltreaktionen können die *Crosslinker* in drei Gruppen unterteilt werden. N,N' -1,2-Dihydroxyethylenbisacrylamid (DHEBA) oder N,N' -Diallyltartardiamid (DATD) können durch Oxidation gespalten werden [O'Connell 1976; Anker 1970]. Die vicinalen Diole der beiden Quervernetzer reagieren mit Periodsäure unter einer Malaprade-Reaktion (Abb. 1.2A).

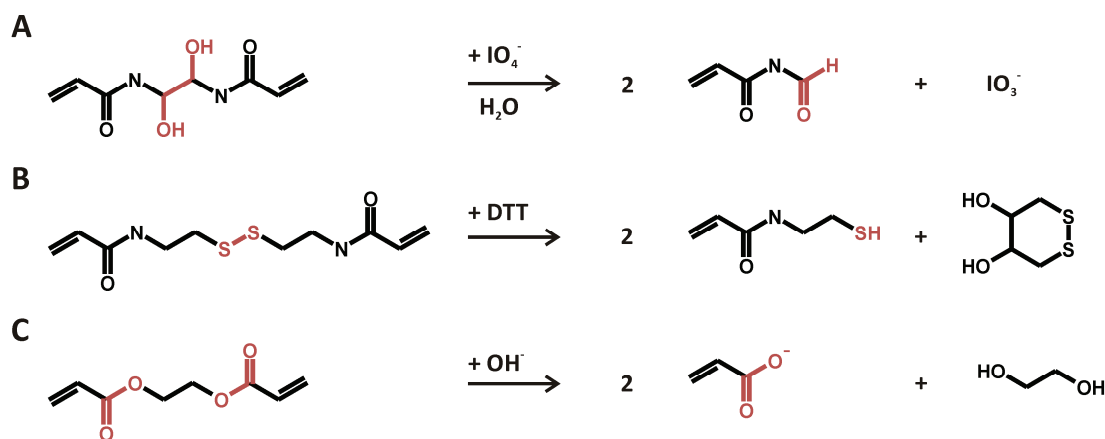


Abb. 1.2 Spaltbare Quervernetzer

Reaktionsabläufe der Spaltung von (A) DHEBA durch Oxidation, (B) BAC durch Reduktion und (C) ETA durch basische Hydrolyse; involvierte Bindungen sind rot gekennzeichnet

Die Sulfidbrücken des *N,N'*-Bisacryloylcystamins (BAC) werden dagegen reduziert (Abb. 1.2B) [Hansen 1976]. Diese Gele können schon unter milden, fast physiologischen Bedingungen verflüssigt werden. Sie sind vor allem für die Fraktionierung von RNA geeignet. Bei der Trennung von Proteinen ist es jedoch notwendig, die zur Denaturierung verwendeten reduzierenden Reagenzien wie Dithiothreitol (DTT) zu entfernen. Zu der alkalisch hydrolysierbaren Quervernetzergruppe gehört die Esterverbindung Ethylenglykoldiacrylat (EDA) (Abb. 1.2C) [Choules 1965]. Während der 1960 und 70er Jahre wurden die spaltbaren *Crosslinker* oft zur Herstellung von auflösbaren Gelen genutzt, um danach die spezifische Aktivität von radioaktivmarkierten Proteinen mit Hilfe eines Szintillationszählers zu bestimmen [Choules 1965; Alpers 1970; Anderson 1973]. Sie haben sich jedoch aus folgenden Gründen nicht zur standardmäßigen Herstellung von Gelmatrices durchgesetzt. DATD kann die Ausbildung eines dreidimensionalen Gels durch Eingreifen in die Acrylamidpolymerisation verhindern [Gelfi 1981]. Andere Quervernetzer haben im Gegensatz zu MBA keine überzeugenden physikalischen Eigenschaften und einen mangelnden Siebeffekt [O'Connell 1976].

Der molekulare Siebeffekt wird durch die Porengröße eines Acrylamidgels bestimmt. Direkten Einfluss hierauf haben die eingesetzten Konzentrationen an Acrylamid und Quervernetzer, die durch die Parameter T% (x Gramm Monomer pro 100 ml) und C% (x Gramm *Crosslinker* im Verhältnis zur Masse der Monomere) dargestellt werden können [Hjerten 1962].

$$T\% = \frac{\{m(\text{Acrylamid}) + m(\text{MBA})\} \times 100}{m(\text{Gellösung})}$$

$$C\% = \frac{m(\text{MBA}) \times 100}{m(\text{Acrylamid}) + m(\text{MBA})}$$

Die Porengröße bei Polyacrylamidgelen mit 3-5% Quervernetzeranteil nimmt linear mit zunehmendem T% ab. Bei steigendem C%-Wert nimmt sie jedoch wieder zu [Hjerten 1969], da vermehrt Bindungen zwischen Crosslinkermolekülen eingegangen werden, die zu keiner Quervernetzung führen. Durch die Kombination aus Porosität, Proteingröße, -form und -ladung wird letztendlich der Laufweg eines Proteins im Gel bestimmt [Ferguson 1964; Maurer 1971; Laemmli 1970].

Bei der Zonenelektrophorese kann es durch Diffusion zu einer schlechteren Bandenschärfe kommen. Außerdem kann die aufgetragene Menge der Probe die Auflösung beeinflussen. Einen weiteren Fortschritt stellte somit die durch Ornstein und Davis entwickelte Tris-Glycin basierte diskontinuierliche Gelelektrophorese dar [Ornstein 1964; Davis 1964], die ein aus zwei Phasen bestehendes Trennmedium nutzt. Der hierbei eingesetzte Elektrodenpuffer setzt sich u.a. aus Tris und Glycin zusammen. Die Puffer zur Herstellung des engporigen Trenngels wie auch des großporigen Sammelgels bestehen ebenfalls aus Tris, enthalten aber Chlorid als Gegenion und unterscheiden sich in ihren pH-Werten (Trenngelpuffer pH 8,8, Sammelgelpuffer pH 6,8). Die Probe wird mit Tris-HCl-Puffer pH 6,8 gemischt, aufgetragen und die Elektrophorese gestartet (Abb. 1.3A)

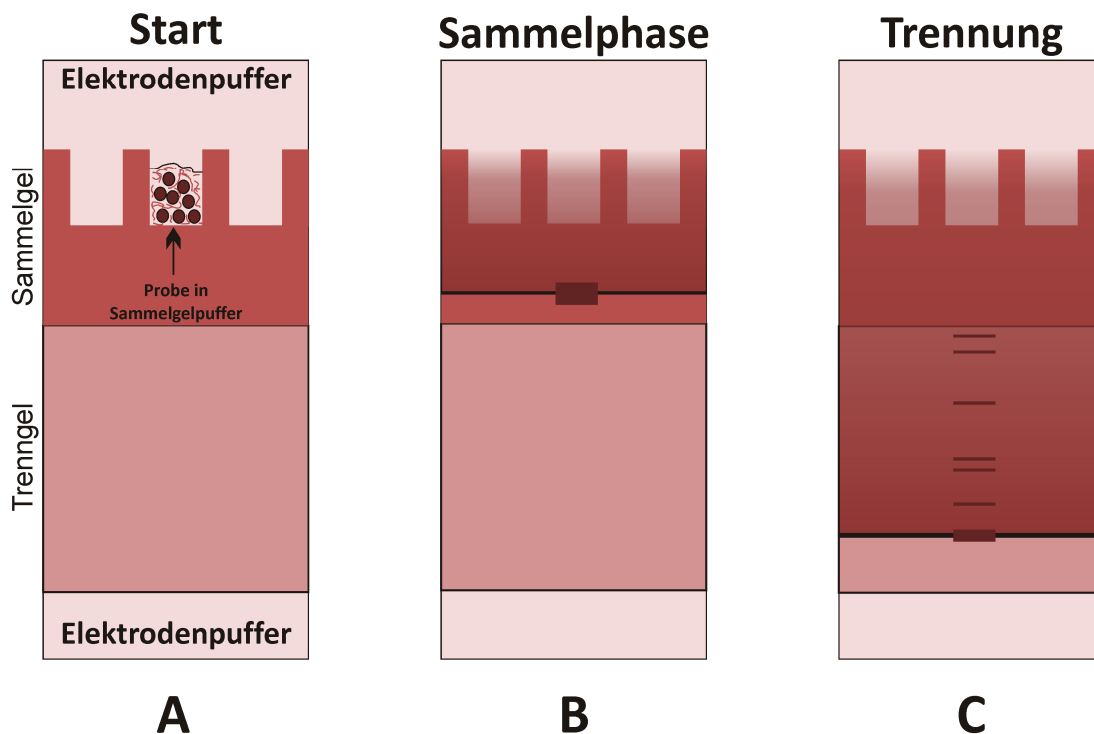


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der diskontinuierlichen Gelelektrophorese

(A) aus zwei Phasen bestehendes Trennmedium (B) Aufkonzentrierung der Proteine (C) Auftrennung der Proteine gemäß ihrer molekularen Masse (nach Rabilloud 2009)

Während das Chloridion negativ geladen ist und als Leition fungiert, liegt das Glycin im Sammelgel, aufgrund der Nähe des vorliegenden pH-Werts zu seinem pI, nur schwach ionisiert vor und hat aufgrund dessen eine viel kleinere Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Während der isotachophoretischen Trennung wird die Probe zwischen den Lauffronten des Leitons Chlorid und des Folgeions Glycin konzentriert und die einzelnen Proteine ordnen sich gemäß ihrer Mobilität an (Abb. 1.3B). Wird der Übergang zwischen Sammel- und Trenngel erreicht, ändern sich pH-Wert und Porengröße. Durch die pH-Änderung liegt das Glycin vollständig als negativ geladenes Glycinat vor, so dass seine Mobilität zunimmt und es die Proteinzone überholt. Die Potentialdifferenz wird damit aufgehoben. Die nachfolgende Trennung erfolgt unter konstantem pH-Wert und die Proteine werden durch das Prinzip der Zonenelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 1.3C).

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese wurde für die Proteinanalytik durch Zusatz des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) zu Gel und Probe optimiert [Shapiro 1967; Laemmli 1970]. Das Detergens lagert sich in einer Konzentration von 1,4 g pro Gramm Protein an und führt zur Denaturierung [Pitt-Rivers 1968]. Da SDS negativ geladen ist, kann die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden und das Verhältnis von Ladung zu Größe ist für jedes Protein in etwa gleich. Somit trennen sich die Proteine im Gel annähernd proportional zu ihrer molekularen Masse auf. Noch heute besitzt die SDS-PAGE eine vorherrschende Rolle unter den elektrophoretischen Techniken. Sie dient unter anderem der Aufreinigung von Proben und der Untersuchung von Proteingemischen, -komplexen sowie zur Auftrennung von deren Isoformen [Righetti 2005b]. Die SDS-PAGE besitzt bei den gelbasierten Trennungen einen vergleichbaren Stellenwert wie RP-Harz als gängigstes Material in der Flüssigchromatographie [Pandey 2000].

Wegen der extremen Größenverteilung von Proteinen muss die elektrophoretische Auflösung oft den experimentellen Anforderungen angepasst werden. Dies kann durch die Änderung der Porengröße des Trenngels geschehen. Nachteilig ist jedoch, dass Gele mit kleinem T% zu elastisch, die mit großem T% zu spröde sind. Aus diesem Grund wird oft ein Gradientengel mit sich ändernder Acrylamidkonzentration eingesetzt, um für alle Proteingrößen eine gute Trennleistung zu erzielen [Rabilloud 2009]. Durch Änderung des Puffersystems können ebenfalls unterschiedliche Auflösungen erreicht werden. Eine bessere Auflösung im kleineren Massenbereich wird bei der Verwendung eines auf

Ammediol basierenden basischen Puffers erzielt [Bury 1981]. Die von Schägger und Jagow entwickelte Elektrophorese mit einem Tris-Tricin-Puffersystem zeigt ebenfalls eine gute Trennung von Proteinen mit kleinerer Masse [Schägger 1987, 2006]. Sie hat den Vorteil, dass nicht im basischen Milieu gearbeitet werden muss, da die Pufferbestandteile einen kleineren pK-Wert als Glycin haben. Bei Taurin-basierten Systemen kann der pH-Wert des Puffers sowohl in saurer als auch in basischer Richtung verschoben und somit zu besseren Trennung von hoch- oder niedermolekularen Verbindungen eingesetzt werden [Tastet 2003].

Einige analytische Fragestellungen erfordern ebenfalls eine Anpassung der gelelektrophoretischen Trennung. So kann SDS durch alternative Detergenzien wie 16-BAC ersetzt werden [Macfarlane 1983], um die Trennung hydrophober Proteine zu erleichtern [Hartinger 1996]. Um den nativen Zustand einer Probe zu erhalten, muss ohne SDS gearbeitet werden wie beispielsweise bei der *Blue-* (BN) oder *Clear-Native* (CN) PAGE. Bei der BN-PAGE wird der anionische Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* G250 (CBB) verwendet, der sich an die Proteine anlagert und ihnen eine gleiche elektrische Ladung gibt, ohne ihre native Struktur zu beeinflussen. Dies ermöglicht die Trennung von ganzen Proteinkomplexen bei neutralem pH-Wert [Schägger 1991; Wittig 2006]. Die CN-PAGE wird unter milderen Bedingungen als die BN-PAGE durchgeführt [Schägger 1994]. Durch den Einsatz von Digitonin als Detergens können z.B. intakte supramolekulare Membranproteinkomplexe in ihrem nativen Zustand erhalten werden [Pfeiffer 2003]. Als Nachteil gegenüber der BN-PAGE kann die schlechtere Auflösung betrachtet werden, und dass durch den Einsatz eines nicht-geladenen Farbstoffs die elektrophoretische Mobilität von der Eigenladung der Proteine abhängt [Wittig 2005]. Mittlerweile gibt es jedoch auch eine hochauflösende CN-PAGE-Technik [Wittig 2007].

Bei Proben mit hoher Komplexität ist oft eine mehrdimensionale Trennung erforderlich. Die SDS-PAGE ist dann häufig der letzte Schritt einer Proteinseparation. Die klassische 2D-PAGE, eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) in der ersten und SDS-PAGE in der zweiten Dimension, ist am Weitesten verbreitet, weil sie die Möglichkeit bietet ganze Proteome zu erfassen und zu analysieren [Görg 2009]. Durch die Kombination zweier völlig unterschiedlicher Trenneigenschaften werden hochauflösende Proteintrennungen erzielt [Voris 1980].

Eine SDS-PAGE als ersten Fraktionierungsschritt beinhaltet das als „GeLC“ bezeichnete Verfahren, bei dem die Proteine in der ersten Dimension mittels SDS-PAGE getrennt, dann im Gel verdaut und anschließend über einen LC-MS/MS-Ansatz identifiziert werden [Simpson 2000; Lasonder 2002].

Bei der IEF werden Proteine aufgrund einer ihrer physikochemischen Eigenschaften, dem isoelektrischen Punkt pI getrennt. Proteine und Peptide wirken durch ihre Seitenketten und Termini sowohl als schwache Basen als auch als schwache Säuren. Der pI ist der pH-Wert, an dem die Zahl an positiven und negativen Ladungen des Proteins/Peptids ausgeglichen und somit die elektrische Ladung des Analyten Null ist. Das Trennmedium enthält einen pH-Gradienten, der aus einer Mischung von Ampholyten besteht und der möglichst alle pIs der Proteine der Probe abdecken sollte. Wenn das saure Ende des Gradienten mit einer Anode, das basische Ende mit einer Kathode verbunden wird, wandern die Analyten im elektrischen Feld bis zu ihrem pI und konzentrieren sich dort auf (Abb. 1.4).

Die erste Beschreibung der 2D-Gelelektrophorese, also IEF in der ersten und der SDS-PAGE in der zweiten Dimension, liegt circa 35 Jahre zurück [MacGillivray 1974]. Erst durch O'Farrell, der ein sehr detailliertes Protokoll für die 2D-PAGE von radioaktiv markiertem *Escherichia coli*-Extrakt veröffentlichte, gelang dieser Technik der Durchbruch. Er erzielte eine bessere Auflösung, indem er chaotrope Salze und Detergenzien zur Proteinsolubilisierung einführte [O'Farrell 1975]. Zeitgleich wurde diese Methodik auch von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt [Klose 1975; Scheele 1975]. Die IEF wies jedoch erhebliche Probleme auf, da durch Variabilität der Trägerampholyte und die Instabilität des pH-Gradienten Experimente schlecht reproduzierbar waren [Görg 2009]. Ein Fortschritt war daher die Entwicklung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) [Bjellqvist 1982], die die einfache Einpolymerisierung von Trägerampholyten in die Gelmatrix ersetzen, indem bifunktionelle Immobiline®-Reagenzien mit unterschiedlichen pK-Werten mit der Acrylamidmatrix kopolymerisiert wurden. Diese Kopolymerisation ermöglicht einen wesentlich stabileren pH-Gradienten und damit eine deutlich besser reproduzierbare IEF. Weitere Meilensteine waren die Entwicklung von IPG-Streifen und deren Anwendung in der 2D-PAGE [Görg 1988] sowie das Protokoll zu deren Äquilibration und der Reduktion und Alkylierung der darin enthaltenen Proteine [Tastet 2003].

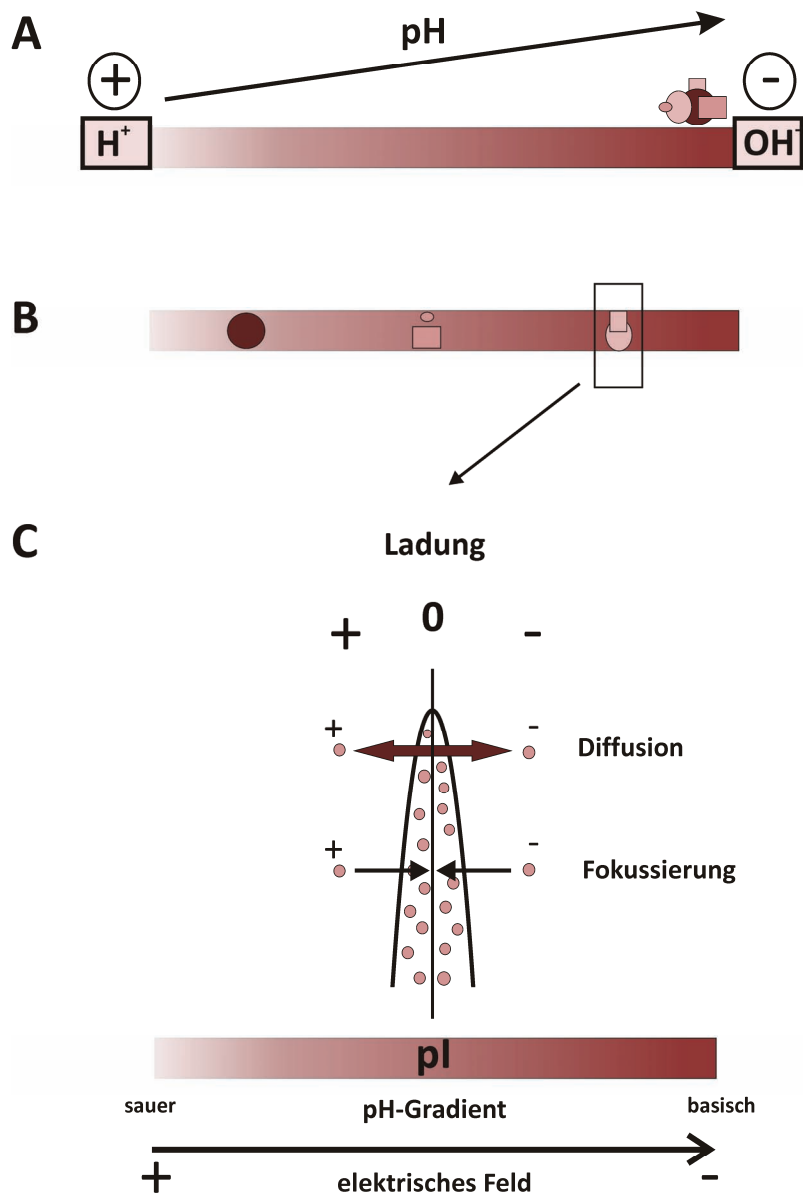


Abb. 1.4 Schematische Darstellung einer IEF

(A) Situation vor der IEF: Proteine sind auf das mit einem pH-Gradienten ausgestattete Gel geladen, das an die Elektroden angeschlossen ist (B) nach dem Ende der IEF liegen die Proteine nach ihrem pI getrennt vor (C) Fokussierungseffekt: elektrisches Feld wirkt der Diffusion entgegen (nach Rabilloud 2009)

Basische Proteine und hydrophobe Proteine sind in der 2D-PAGE stark unterrepräsentiert [Wilkins 1998; Santoni 2000; Yuan 2007]. Doch zweidimensionale Trennstrategien beschränken sich nicht nur auf die IEF/SDS-PAGE. Es bieten sich auch andere Kombinationsmöglichkeiten wie zum Beispiel 16-BAC/SDS-PAGE, *doubled* SDS-PAGE (dSDS) oder CTAB/SDS-PAGE, die alle gezielt für die Trennung von Membranproteinen entwickelt wurden [Hartinger 1996; Rais 2004; Hunzinger 2006].

1.1.4 Visualisierungsmethoden

Detektionsmethoden von Proteinen nach erfolgreicher gelelektrophoretischer Trennung haben eine wichtige Schlüsselrolle in der Proteinanalytik. Am häufigsten kommen Färbetechniken zum Einsatz. Diese sollten linear, homogen, kostengünstig, anwenderfreundlich und vor allem sensitiv sein und nachfolgende Prozesse wie die massenspektrometrische Analyse nicht beeinträchtigen.

Zur ersten Gruppe gehören die organischen Farbstoffe. Die Färbung von Proteinen mit CBB wurde schon 1963 publiziert [Fazekas de St. Groth 1963]. Mittlerweile stellt die Färbung mit kolloidalem CBB den Goldstandard dar [Neuhoff 1985, 1988]. Über elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkung lagert sich der Triphenylmethanfarbstoff an die Proteine an. Diese einfache kostengünstige Technik ist sehr gut Massenspektrometrie-kompatibel, jedoch mit einem Detektionslimit von 8-10 ng nicht sehr empfindlich [Sitek 2006]. Eine sensitivere Methode ist die Zink-Imidazol-Färbung, die auf der durch Proteine verzögerten Zinkpräzipitation beruht [Fernandez-Patron 1992; Castellanos-Serra 1996]. Sie ist vollkommen reversibel und schnell durchzuführen. Trotz dieser Vorteile wird die Methode selten angewendet, da sie eine schlechte Linearität besitzt und als Negativfärbung (durchscheinende Bande auf weißem Hintergrund) schwierig auszuwerten ist. Eine weitere Färbetechnik wird durch die Bildung von Ionenpaaren ermöglicht [Choi 1996]. Bei der EZ-Technik reagiert der kationische Farbstoff Ethylviolett mit dem anionischen Zincon, indem sie ein Ionenpaar bilden und sich an die Proteine anlagern. Die Methode ist MS-kompatibel, schnell durchzuführen und ihr Detektionslimit entspricht dem der kolloidalen CBB-Färbung [Choi 2004].

Die zweite Gruppe der Färbemethoden wird durch die seit 30 Jahren bekannte Silberfärbung repräsentiert [Switzer 1979]. Silberionen lagern sich durch Salz- und Komplexbildung an die Seitenketten der Aminosäuren an. Es gibt eine Vielzahl von Färbeprotokollen, da die Durchführung der Technik in vielen Schritten variiert und ständig neu angepasst wird. Folgt nach der Färbung eine massenspektrometrische Analyse, wird häufig die von Shevchenko entwickelte Methode verwendet [Shevchenko 1996]. Die Silberfärbung ist hoch sensitiv (ca. um den Faktor 10 besser als kolloidales CBB) [Patton 2002], hat eine gute Homogenität und deckt einen linearen Detektionsbereich über zwei Größenordnungen ab.

Der kostengünstige Färbeprozess zeigt jedoch einige Nachteile: die verwendeten Lösungen sind von geringer Stabilität und benötigen eine zügige Durchführung. Durch die Färbemethodik können die Proteine vor allem durch *Crosslinking*-Effekte des Formaldehyds stark immobilisiert werden [Richert 2004]. So ist die Peptidanzahl bei gleicher Menge an Ausgangsprotein im Vergleich zu einer kolloidalen CBB-Färbung geringer [Winkler 2007]. Dessen ungeachtet ist diese Färbung bei geringer Probenmenge aber das Mittel der Wahl.

Die dritte Gruppe stellen die Fluoreszenz-basierten Farbstoffe dar. Sie haben gemeinsam, dass die Färbung eine sehr gute Homogenität zeigt und über einen großen dynamischen Bereich verfügt, der sich über mindestens zwei Zehnerpotenzen erstreckt. Beispiele für diese Gruppe sind die anionischen Rutheniumkomplexe *Sypro Ruby* und *RuBPS* [Berggren 2000; Rabilloud 2001]. Auch hier wird die Färbung durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufen. Die Fluoreszenz-Färbungen zeigen ein besseres Detektionslimit als kolloidale CBB-Färbungen und sind vergleichbar sensitiv wie Silber, sind jedoch weniger massenspektrometrisch kompatibel [Chevalier 2004].

Einige biologische Fragestellungen erfordern Detektionsverfahren, die nicht direkt in Gelen anzuwenden sind wie der spezifische Nachweis eines bestimmten Proteins mittels Antikörperreaktion. Aus diesem Grund wird die Probe nach erfolgter SDS-PAGE elektrophoretisch auf Trägermembranen z.B. aus Polyvinylidenfluorid, Nylon oder Nitrocellulose transferiert, wobei das ursprüngliche Trennmuster erhalten bleibt. Der von Burnette eingeführte Begriff *Western Blot* bezieht dieses Verfahren auf die Übertragung von Proteinen [Burnette 1981], die Methode an sich wurde aber schon früher durch zwei unabhängige Autoren beschrieben [Renart 1979; Towbin 1979]. Die auf die Membran geblohteten Proteine können mit CBB oder Ponceau S angefärbt werden. Beim Immunblot erfolgt der selektive Proteinnachweis mittels Antikörperreaktion. Beim direkten Nachweis werden antigenspezifische Antikörper eingesetzt, die mit dem entsprechenden Epitop des Proteins reagieren. Bei der indirekten Methode wird der erste Antikörper durch einen Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Visualisierung erfolgt z.B. über Radioaktivität durch Schwärzung eines fotografischen Films oder über ein am Antikörper gebundenes Enzym, das durch Zugabe eines entsprechenden Substrats eine Farb- oder Lumineszenzreaktion auslöst.

1.1.5 Proteolyse

Die Spaltung eines Proteins in Peptide wird als Proteolyse oder Verdau bezeichnet. Der enzymatische Verdau wird häufiger angewendet als der chemische, da die Durchführung standardisiert ist und in der Regel eine hohe Peptidausbeute erhalten wird. Ebenso besitzen einzelne Enzyme eine geeignete Schnittspezifität, um Peptide optimaler Länge mit guten Ionisationseigenschaften zu erzeugen. Die chemischen Agenzien werden deshalb überwiegend als Hilfsreagenzien eingesetzt, um zusätzliche Schnitte zu erhalten [Speers 2007]. Für die Proteolyse eines Proteins ist die Menge an eingesetztem Enzym von entscheidender Bedeutung. Im Allgemeinen werden Enzym-zu-Protein-Verhältnisse von 1:5 bis 1:100 empfohlen. Bei der Verwendung von zu wenig Protease werden auch kleinere Peptidmengen generiert, während zu viel Protease einen Selbstverdau derselben hervorruft und damit die nachfolgende Analyse negativ beeinflusst. Der pH-Wert bestimmt ebenfalls das Verdauergebnis, da jedes Enzym einen optimalen pH-Wert besitzt, bei dem es am effektivsten schneidet [Capelo 2009].

Als Goldstandard gilt die 23,5 kDa große Serinprotease Trypsin, die spezifisch Amidbindungen carboxyterminal zu Arginin und Lysin spaltet [Olsen 2004]. Da im Durchschnitt jede 10. bis 12. Aminosäure ein Lysin oder Arginin darstellt, werden Peptide mit einer molaren Masse zwischen 800 und 2500 Da generiert, die dementsprechend gut für massenspektrometrische Untersuchungen geeignet sind. Ein weiterer Vorteil ist die gute Ionisierung der Peptide in der Gasphase des Massenspektrometers, hervorgerufen durch den basischen C-Terminus, an dem die positive Ladung lokalisiert ist. Hierdurch werden auch homogenere Fragmentierungen durch CID erzielt [Canas 2007].

Der tryptische Verdau unterliegt jedoch einigen Limitierungen, besonders im Hinblick auf den Nachweis von Membranproteinen. Diese haben häufig nur wenige tryptische Schnittstellen, so dass – wenn überhaupt – große Peptide mit hydrophoben Eigenschaften erhalten werden. Zur Lösung dieses Problem wurden mehrere Protokolle angepasst und weiterentwickelt. Neben Trypsin kann zusätzlich mit einer weiteren Protease anderer Spezifität (z.B. Chymotrypsin) oder einem chemischen Spaltreagenz hydrolysiert werden, um Schnitte in den hydrophoben Bereichen zu erzeugen [Fischer 2006a]. Der Einsatz alternativer weniger-spezifischer Proteasen hat sich auch ohne Trypsin als förderlich

erwiesen [Fischer 2006b; Speers 2007]. So wurde die Serinprotease Elastase früher nur zum Nachweis von Phosphorylierungen verwendet [Schlosser 2001, 2002], eignet sich aber auch sehr gut für die Untersuchung von Membranproteinen [Rietschel 2009].

Auch Pepsin wurde als Protease zur Analyse von Membranproteinen eingesetzt [Jansson 2008], z.B. zur Charakterisierung von Aquaporin [Han 2004]. Die aus 326 Aminosäuren bestehende Aspartatprotease hat ein Molekulargewicht von 34,6 kDa und wurde im 19. Jahrhundert als erstes Enzym überhaupt entdeckt. Das Enzym hydrolysiert Peptide im pH-Bereich von 1 bis 6. Oberhalb dieses pH-Bereichs wird die Protease irreversibel inaktiviert [Takahashi 2004]. Bisher wurde sie überwiegend in Wasserstoff/Deuterium-Austauschexperimenten verwendet, einer wichtigen Methode, um Strukturen und Protein-Protein-Wechselwirkungen von löslichen Proteinen zu bestimmen [Zhang 2008]. Vor allem die enzymatische Aktivität bei saurem pH-Wert sowie der breite Spezifitätsbereich von Pepsin sind für diese Anwendung von Vorteil. Die peptische Spaltung erfolgt hauptsächlich C-terminal nach F und L sowie bevorzugt nach M, C und E. Allerdings beruhen diese Ergebnisse hauptsächlich auf Verdaus mit der auf Säulen immobilisierten Protease und/oder kürzeren Inkubationszeiten [Schmelzer 2007; Hamuro 2008]. Sämtliche beschriebenen Experimente mit Elastase und Pepsin wurden in Lösung realisiert. Mit diesen Enzymen sind bisher keine proteolytischen Verdaus im Gel bekannt.

1.1.6 Proteolytischer Verdau im Gel

Durch die Entwicklung der sanften Ionisierungstechniken MALDI und ESI [Karas 1988; Fenn 1989] wurden Polypeptide für die Massenspektrometrie zugänglich und machten diese Analysemethode zum Mittel der Wahl für die Proteinidentifizierung nach PAGE-Experimenten. Bei gelbasierten Trennmethode wird jedoch üblicherweise eine Messung mittels MALDI verwendet. Die zu untersuchenden Peptide werden durch enzymatische Proteolyse des im Gel eingebetteten Proteins erzeugt [Rosenfeld 1992; Shevchenko 2006]. Der komplette Ablauf des in-Gel Verdaus, bestehend aus Entfärben, Reduktion und Alkylierung von Cysteinen, Diffusion der Protease in die Gelmatrix, enzymatischer Spaltung des Proteins und anschließender Extraktion der entstandenen Peptide aus dem Gel, ist entscheidend für den Erhalt von qualitativ guten Massenspektren [Granvogl 2007]. Diese konventionelle Prozedur bringt jedoch Schwierigkeiten mit sich, beispielsweise kann

die Proteolyse unvollständig sein oder es gibt Probleme bei der Wiederfindung von bestimmten Peptiden aus dem Gel [Havlis 2004]. So können während des Arbeitsablaufs in Abhängigkeit von Proteintyp und verwendeter Konzentration Verluste zwischen 15 und 50% auftreten [Hellmann 1995; Stewart 2001; Speicher 2000]. Zwei Gründe für ein Peptiddefizit während des Verdaus könnten durch die Gelmatrix selbst begründet sein, da sie eine physikalische Hürde für die optimale Enzymabsorption und Peptidextraktion darstellt. Die Protease muss als eher großes Molekül Zugang zu ihrem Substrat, dem Protein, erhalten. Dieser Prozess wird jedoch durch das Gelnetzwerk aus Acrylamidfäden erschwert [Rabilloud 2009]. Außerdem stellt die engmaschige Polyacrylamidstruktur eine große Oberfläche dar, die die Anlagerung der frisch entstandenen Peptide begünstigt, insbesondere wenn sie hydrophobe Eigenschaften besitzen. Zur Minimierung dieses Datenschwunds wurde in früheren Studien eine Optimierung der allgemeinen Durchführung versucht sowie der Einsatz von Detergenzien, organischen Lösungsmitteln, Mikrowellenstrahlung, Ultraschall oder immobilisierten Enzymen erprobt [Lazarev 2009]. Werden diese Ergebnisse jedoch mit einem Lösungsverdau verglichen, bleibt das grundlegende Problem der geringeren Sensitivität bestehen.

1.2 Membranproteine

Biologische Membranen bilden wichtige Barrieren zwischen Zellen und ihrer externen Umgebung. In Eukaryonten dienen sie zusätzlich als Abgrenzung von intrazellulären Organellen. Viele Funktionen der aus einer Lipid-Doppelschicht bestehenden Membran werden durch in sie eingebettete oder angeheftete Proteine, die Membranproteine ausgeübt. Deren Einteilung kann nach ihrer Assoziation mit der Membran vorgenommen werden. Einige Proteine wie der spannungsabhängige anionenselektive Kanal durchlaufen die Membran als aus β -Faltblättern gebildete Poren [Lawen 2005], die meisten besitzen jedoch aus nichtpolaren Aminosäuren bestehende Bereiche mit α -helikaler Sekundärstruktur. Periphere Membranproteine sind nur an der Membran assoziiert, entweder über Interaktionen mit anderen Membranproteinen oder direkt über Wechselwirkungen mit den polaren Gruppen der Lipide. Integrale Transmembranproteine durchdringen die Phospholipid-Doppelschicht mindestens einmal vollständig [Alberts 1994]. Es gibt bioinformatischen Programme, die anhand der Aminosäuresequenz die Existenz von transmembranen Helixabschnitten mit hoher Zuverlässigkeit durch Berechnung vorhersagen können wie z.B. das TMHMM-Programm [Krogh 2001; Moller 2001]. Mit zunehmender Anzahl an α -Helices wird auch die relative Hydrophobizität des Proteins größer. Zum besseren Vergleich dieses Parameters kann der GRAVY-Score herangezogen werden [Kyte 1982], der auf dem arithmetischen Mittelwert der Hydrophobizitäten aller Aminosäuren eines Proteins beruht. Ist er im negativen Bereich, handelt es sich um hydrophilere Proteine, positive Werte weisen auf einen lipophilen Charakter des Proteins hin.

Etwa ein Drittel des Genoms kodiert für Membranproteine [Stevens 2000], so ist diese Gruppe in vielen zellulären Prozessen zum Beispiel beim vesikulären Membranfluss, der Signaltransduktion oder beim Ionentransport von großer Bedeutung [Ott 2002; Torres 2003; Zhou 2004]. Auch beim Energiegewinn der Zelle sind Membranproteine beteiligt, denn die Proteinkomplexe der Atmungskette sind in der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryonten bzw. in der Cytoplasmamembran von Prokaryonten lokalisiert (Abb. 1.5). Der größte Enzymkomplex NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (I) oxidiert NADH, überträgt zwei Elektronen zum Ubichinon und transportiert vier Protonen über die Membran. Das reduzierte Ubichinol wird zum bc1-

Komplex (III) transferiert, der weitere Protonen in den äußeren Membranbereich pumpt und Cytochrom c reduziert. Durch die Cytochrom c-Oxidase (IV) wird Cytochrom c in Verbindung mit erneuten Protonenübertragungen wieder oxidiert. Hierdurch entsteht ein Membranpotential, das die ATP-Synthase (V) dazu veranlasst, ADP zu phosphorylieren. [Friedrich 2004; Yagi 2003; Brandt 2006].

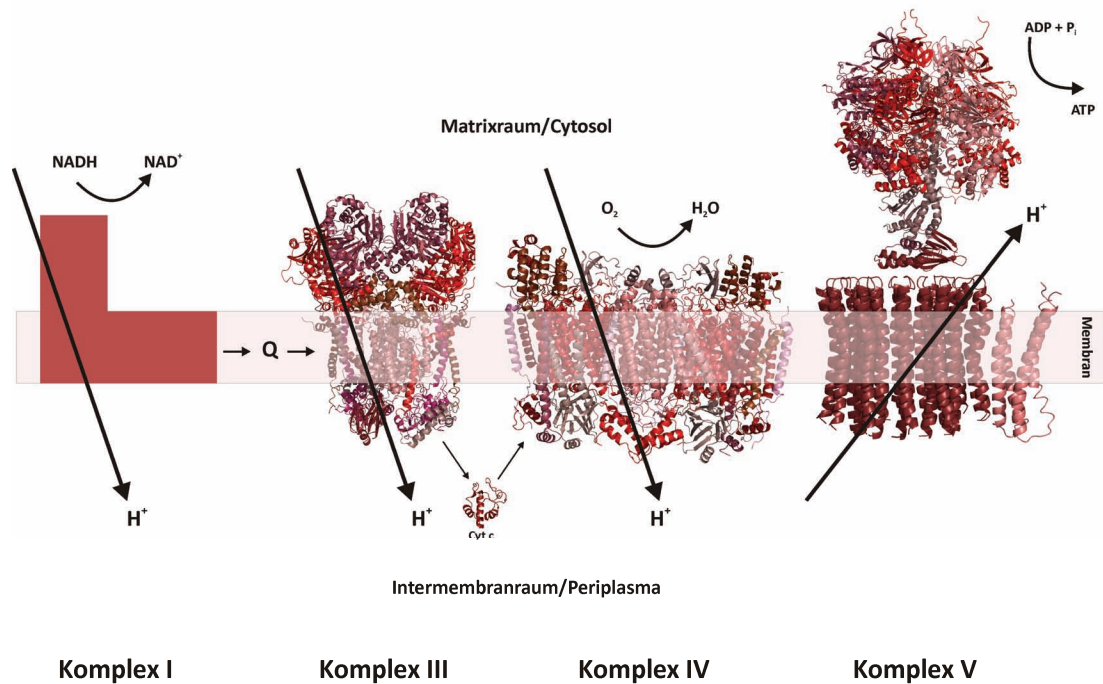


Abb. 1.5 Darstellung der Atmungskette

Strukturen der vier an der Atmungskette beteiligten Proteinkomplexe; Komplex I ist nur schematisch dargestellt, da noch keine näheren Strukturmerkmale bekannt sind (nach Yoshida 2001)

Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase ist das komplexeste Enzym der Atmungskette. Der Komplex kann in drei funktionelle Einheiten unterteilt werden: das N-Modul, das NADH oxidiert, das Q-Modul, das Ubichinon reduziert und das P-Modul, welches die Protonen durch die Membran transportiert. Das P-Modul setzt sich aus sieben sehr hydrophoben Untereinheiten zusammen und ist in die Membran eingelagert. Der gesamte Proteinkomplex hat eine molekulare Masse von etwa 1 MDa in Eukaryonten und 550 kDa in Prokaryonten. Diese Massendifferenz lässt sich durch die unterschiedliche Anzahl an Untereinheiten in beiden Organismengruppen erklären. Während der kleinste bakterielle Komplex nur aus 14 Untereinheiten besteht, setzen sich eukaryontische Komplexe aus 14

zu Prokaryonten homologen und mehr als 26 zusätzlichen Untereinheiten zusammen. Folglich gibt es auch funktionelle Unterschiede [Clason 2010]. Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse belegen, dass der Komplex L-förmig ist und aus einem peripheren Arm und einem intrinsischen Membranarm (P-Modul) besteht (Abb. 1.5) [Grigorieff 1998].

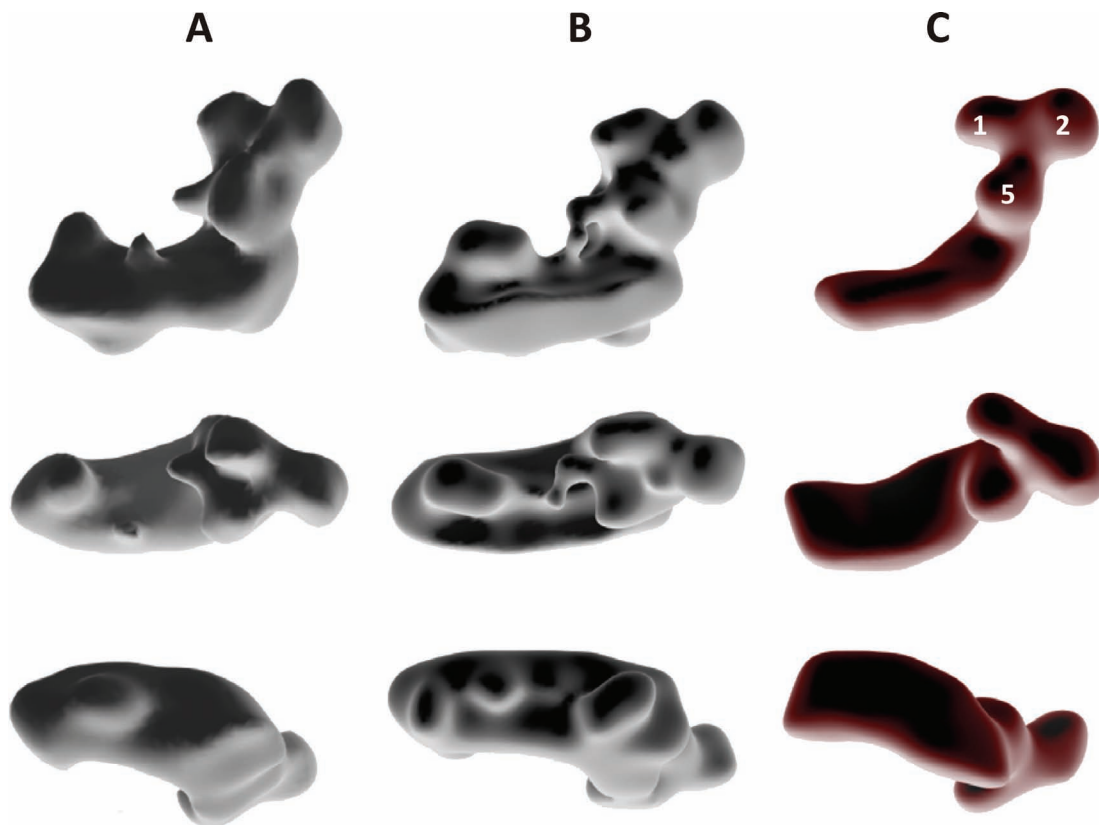


Abb. 1.6 Strukturen der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase unterschiedlicher Spezies

Aufnahme mittels 3D-Elektronenmikroskopie. Rekonstruktionen von (A) *Yarrowia lipolytica* (B) *Bos taurus* (C) *A. aeolicus*; (nach Clason 2010)

Neuere Untersuchungen zeigen, dass sowohl in Eu- wie auch in Prokaryonten im peripheren Arm die konservierten Domänen 1, 2 und 5 vorliegen. Über weitere Ähnlichkeiten kann aufgrund mangelnder Auflösung noch keine Aussage getroffen werden (Abb. 1.6) [Clason 2010]. Der aus Bakterien isolierte Komplex scheint jedoch instabil und von variierender Morphologie zu sein [Leif 1995]. Dies wird durch Elektronenmikroskopie bestätigt, da verschiedene Präparationen Partikel mit unterschiedlichen Formen zur Folge haben. Dies erklärt auch, weshalb noch keine Kristall- oder hochaufgelöste Struktur des Enzyms bekannt ist. Das Funktionsprinzip ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert [Degli Esposti 1994; Brandt 2003; Ohnishi 2005].

Die Analyse des Genoms des hyperthermophilen Eubakteriums *Aquifex aeolicus* zeigt 24 Gene, die für 13¹ verschiedene nicht homologe Untereinheiten der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase codieren [Deckert 1998]. Die meisten existieren demzufolge in zwei oder drei Isoformen. Der aktive Komplex konnte bereits stabil aufgereinigt und einige Untereinheiten per Edman-Sequenzierung nachgewiesen werden [Peng 2003]. Auch die massenspektrometrische Analyse per 2D-nanoLC-MS/MS oder BN/SDS-PAGE und anschließender MALDI MS-Messung zur Aufklärung der Komplexzusammensetzung wurde bereits durchgeführt [Guiral 2009]. Der Komplex III (Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase) bildet das Mittelstück der Atmungskette. Bei Mensch und Schwein setzt er sich aus 11 Untereinheiten zusammen. Drei von ihnen tragen prosthetische Gruppen: Cytochrom b, das Eisen-Schwefel-Protein und Cytochrom c [Schägger 1986]. Eine delipidierte Form des Komplexes, in der die Rieske Eisen-Schwefel- sowie die 6,4 kDa-Untereinheit fehlen, ist als D2Ant (Delipidation, 2 fehlende Untereinheiten, Antimycin stabilisiert) bekannt [Schägger 1995].

Obwohl Fortschritte bei der Untersuchung von Membranproteinen erzielt wurden, ist diese Proteingruppe in *Proteomics*-Studien oft unterrepräsentiert [Macher 2007; Santoni 2000]. Die Proteinklasse ist sehr heterogen und es gibt kein allgemeingültiges Standardprotokoll zu Extraktion, Solubilisierung und Trennung [Josic 2007]. Auch wegen ihres wenig abundanten Vorkommens und ihrer schlechten Detektierbarkeit, vor allem in Gegenwart von hydrophilen Kontaminationen, ist es nötig, Membranproteine z.B. durch angepasste Protokolle zu isolieren und durch subzelluläre Fraktionierung anzureichern [Fischer 2006b; Speers 2007; Tan 2008]. Für die Entwicklung neuer Protokolle wird oft das aus sieben

¹ in *Aquifex aeolicus* werden zwei der 14 Untereinheiten als homologe Isoformen angesehen (Nuo D1/D2).

Transmembranhelices bestehende Bacteriorhodopsin (BR) verwendet (Abb. 1.7) [Ovchinnikov 1987]. Die aus Purpurmembranen von *Halobacterium salinarium* gewonnene H^+ -ATPase ist ein sehr gutes Modellprotein, da es als schlecht proteasezugänglich gilt und aufgrund dessen schlecht zu identifizieren ist [Blonder 2004]. Außerdem ist es in größeren Mengen kommerziell erhältlich und stellt somit die Grundlage für zahlreiche Experimente dar.

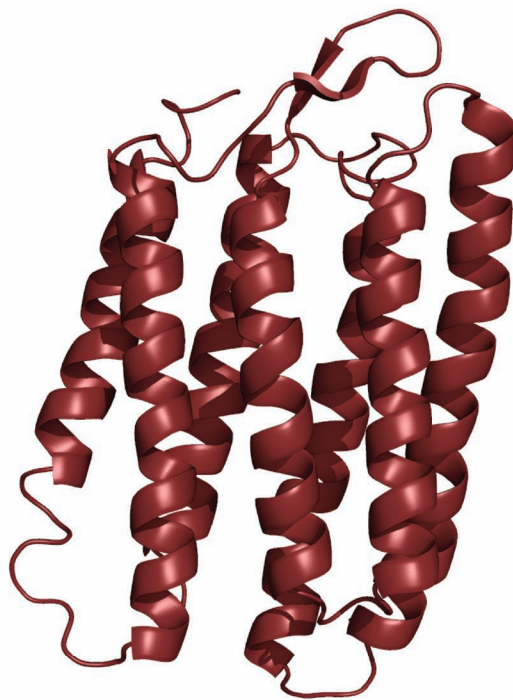


Abb. 1.7 Schematische Darstellung des Proteins Bacteriorhodopsin

Struktur des 27 kDa großen Transmembranproteins BR, die sieben Helices sind als solche dargestellt

Das langfristige Ziel der Membranproteomics ist durch Weiterentwicklung in Probenvorbereitung, Trennung und Analyse die routinemäßige Identifizierung und Charakterisierung von Membranproteinen zu ermöglichen, um gleichwertige Ergebnisse wie für lösliche Proteine zu erzielen.

1.3 Massenspektrometrie zur Proteinanalyse

Die Massenspektrometrie hat sich zur wichtigsten physikalischen Technik in der analytischen Chemie entwickelt, da sie sich im Vergleich zu anderen Methoden durch eine hohe Sensitivität für die qualitative als auch quantitative Bestimmung kleiner Probenmengen auszeichnet. Eine massenspektrometrische Analyse konnte lange Zeit nur mit kleinen, thermostabilen Molekülen durchgeführt werden, da andere Verbindungen wie Proteine und Peptide eine Ionisationstechnik erforderten, die den Analyt ohne extensive Zersetzung in die Gasphase überführt. Die Entwicklung der sanften Ionisierungstechniken Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Elektrospray-Ionisation (ESI) Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts [Karas 1988; Fenn 1989] ermöglichte dann die erfolgreiche Messung von intakten Biomoleküle mittels MS und eröffnete der *Proteomics*-Gemeinde damit die Möglichkeit, routinemäßige Messungen und großflächige Hochdurchsatzanalysen durchzuführen.

Massenspektrometer sind dazu geeignet das Molekulargewicht von Polypeptiden zu bestimmen und/oder zusätzliche Informationen über Struktur, Aminosäuresequenz und Art und Lokalisierung von PTMs zu erhalten. Ein Massenspektrometer besteht im Allgemeinen aus der Ionenquelle, in der Probenmoleküle in Gasphasenionen überführt werden, aus einem Massenanalysator, der die ionisierten Analyten nach ihrem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) auftrennt und einem Detektor, der die Ionenanzahl bei jedem m/z festhält (Abb. 1.8) [Han 2008].

In der Regel finden Massenanalyse und Detektion im Vakuum statt. Die Ionisation kann ebenfalls im Vakuum geschehen, oder aber unter Atmosphärendruck, wobei anschließend der Transfer ins Hochvakuum erfolgt. Es ist möglich durch die Kombination verschiedenster Ionisationstechniken und Massenanalysatoren unterschiedliche Instrumentenkonfigurationen zu erstellen.

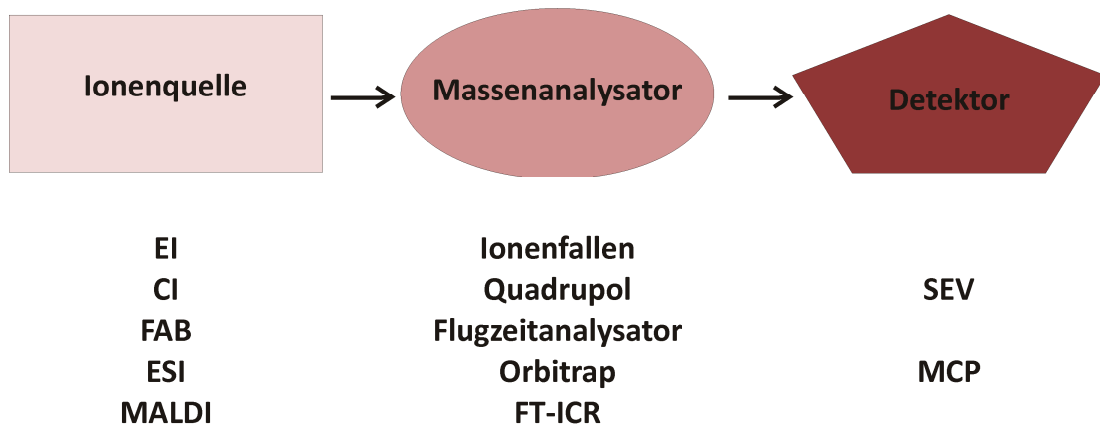


Abb. 1.8 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Durch Zusammensetzung unterschiedlicher Ionenquellen, Massenanalysatoren und Detektoren können verschiedene Massenspektrometer gebaut werden

Massengenauigkeit und Auflösung sind die zwei wichtigsten Leistungsparameter eines Massenspektrometers. Die Auflösung charakterisiert die Fähigkeit, zwei Ionen mit sehr ähnlicher Masse noch zu trennen und wird durch folgende Formel beschrieben:

$$\text{Auflösung } A = \frac{m}{\Delta m}$$

Δm beschreibt die kleinste Massendifferenz, die noch getrennt dargestellt werden kann. Oft wird Δm aber nicht durch benachbarte Signale bestimmt, sondern über die Breite des Signals der Masse m . In der Regel wird dann die Breite auf halber Höhe verwendet (*full width half mean* - FWHM).

Die Massengenauigkeit kann durch absolute Werte in Da oder in der relativen Größe ppm dargestellt werden. Die Anzahl an wahrscheinlichen Aminosäurekompositionen einer Masse wird mit zunehmender Genauigkeit kleiner [Takach 1997; Clauser 1999; Sleno 2005]. So kann z. B. eine Genauigkeit von 1 ppm 99% der Peptide ausschließen, die dieselbe nominale Masse, aber unterschiedliche Element- und Aminosäurezusammensetzungen besitzen [Zubarev 1996].

Die Leistungsfähigkeit eines Geräts wie Auflösungsvermögen, Detektionslimit und Massengenauigkeit hängen vom Typ, der Ionisierungsmethode und der Scanrate d.h. dem

aufgenommenen Massenbereich pro Zeiteinheit ab. Ein Vergleich kann kaum geführt werden, da die Spezifikationen auch von Applikation, Art der Probe und dem experimentellen Aufbau und Ablauf abhängig sind. Die Qualität der Daten wird zudem noch von den Aufnahmeparametern beeinflusst. Je nach Anforderung wie Identifizierung oder Quantifizierung muss somit ausgewählt werden, welche Strategie und welches Instrument das Beste ist.

1.3.1 Allgemeine Ionisierungsmethoden

Die Geschichte der Massenspektrometrie begann schon Ende des 19. Jahrhunderts [Thomson 1897]. Durch weitere Forschung wurde die Technik der Elektronstoßionisation (EI – *electron impact*) [Aston 1917; Dempster 1918; Bleakney 1929] entwickelt. 1966 wurde die chemische Ionisation (CI – *chemical ionization*) durch Munson und Field eingeführt [Munson 1966]. Diese Methode, die später weitverbreitet und kommerzialisiert wurde, repräsentierte einen weiteren Fortschritt auf dem Weg zur schonenden Ionisation wie auch die schon früher entdeckte Feldionisation (FI) [Beckey 1958]. EI und CI sind über einen langen Zeitraum die beiden klassischen Ionisierungstechniken in der Massenspektrometrie. Da sie Gasphasen-Prozesse darstellen, basieren beide allerdings auf der Vaporisation der Probe durch Hitze, die für polare Verbindungen erst nach einer Derivatisierung möglich ist. Somit sind diese Methoden nicht für große thermolabile Biomoleküle geeignet, da diese unter den beschriebenen Bedingungen zerfallen. Beckey entwickelte später die Technik der Felddesorption. Er zeigte, dass ein underivatisiertes Kohlenhydrat ohne zu zerfallen von der Oberfläche einer FI-Anode ionisiert werden kann, und dass dies ebenfalls für Peptide gilt [Beckey 1969; Winkler 1970]. Bei der Methode der Laser Desorption/Ionisation wird ein fokussierter Laserimpuls verwendet, um die Emission von Ionen aus einem Substrat zu erzeugen [Fenner 1966; Vastola 1970]. Die Technik der Plasma Desorption (PD) nutzt die energiereichen Partikel, die durch spontanen Zerfall von ²⁵²Californium entstehen, um die Emission von Ionen aus einem Substrat zu bewirken [Macfarlane 1976]. Bis zur Entwicklung von MALDI wurde PD häufig zur Untersuchung von Molmassen größer 2000 Da angewendet. Allerdings waren die generierten Signale durch metastabilen Ionenzerfall während des Ionentransits durch das Flugrohr sehr breit, und auch die Störsignale waren oft größer als die des eigentlichen Analyten [Fenyö 2008].

Eine neue Ära im MS-Bereich läutete die Entdeckung von *Fast atom bombardement* (FAB) ein [Barber 1981]. Hierbei wird die Probe in einer viskosen Flüssigkeit wie Glycerol gelöst. Durch den Beschuss mit neutralen Argonatomen verdampft und ionisiert die polare Verbindung unter minimalem Zerfall von der Oberfläche der flüssigen Matrix. Ionen werden aus der Lösung und durch einen Desorptions-/Ionisationsprozess in die Gasphase überführt. Dieser produziert Spektren von großen, nichtflüchtigen Verbindungen mit S/N-Werten ähnlich wie bei EI [Gelpi 2008]. Bis zu diesem Zeitpunkt war MS für die Anwendung für Peptide und Proteine eher limitiert, doch mit Hilfe dieser Technik konnten große Peptide wie Mellitin analysiert werden. In den folgenden Jahren wurde FAB eine gut etablierte Methode zur Strukturanalyse von Peptiden [Bean 1991] und vor der Entwicklung der sanften Ionisationstechniken MALDI und ESI konnten große Biomoleküle ausschließlich mit FAB studiert werden [Gelpi 2009].

1.3.2 ESI

Beim Prozess der Elektrospray-Ionisation (ESI) werden ionisierte Moleküle aus einer verdünnten Probelösung erhalten, indem ein Spray von kleinen hoch geladenen Tröpfchen in Anwesenheit eines elektrostatischen Felds erzeugt wird [Dole 1986].

Die Arbeitsgruppe um J.B. Fenn fand heraus, dass sich diese Ionisierungstechnik sehr gut für die massenspektrometrische Untersuchung von Peptiden und Proteinen eignet [Yamashita 1984; Whitehouse 1985; Meng 1988; Fenn 1989]. Während des Ionisierungsprozesses unter Atmosphärendruck wird der typischerweise in Wasser, organischem Lösungsmittel und einem geringen Säureanteil gelöste Analyt über eine Kapillare kontinuierlich in die Ionenquelle eingebracht. Die hohe Spannung (2-6 kV) am Ende der Kapillarspitze und der Öffnung des Massenspektrometers bewirkt, dass ein charakteristischer Flüssigkeitskonus (*Taylor Cone*) entsteht und die Flüssigkeit durch die Kapillaröffnung als feiner Nebel von kleinen geladenen Tröpfchen versprüht wird [Taylor 1964]. Durch Gas- oder Hitzezufuhr auf dem Weg ins Vakuum verdampft das Lösungsmittel und die Tröpfchen verkleinern sich bis sie durch die Abstoßung durch die gleichnamige Ladung so instabil werden, dass sie in kleinere Tröpfchen explodieren (Coulombexplosion).

Die Prozesse bei der Ionenentstehung wurden und werden kontrovers diskutiert und erklärt. Einerseits wird in Erwägung gezogen, dass das elektrische Feld durch den hohen Ladungsüberschuss groß genug ist, um die Desorption der ionisierten Probenmoleküle aus dem Tropfen zu bewirken (Feldverdampfungsmodell). Auch eine komplette Desolvatisierung einzelner Analytionen aus Nanotropfchen, die nur noch ein einzelnes Analytmolekül enthalten, wird vorgeschlagen (*Charge-Residue-Modell*) [Loo 1988; Smith 1990].

Durch die schrumpfenden Tröpfchen können mehrfach geladene Ionen eines Analyten erzeugt werden, die sich häufig über einen großen Bereich an Ladungszuständen verteilen [Covey 1988; Fenn 1990]. Dies ist ein besonderes Merkmal dieser Ionsierungstechnik. Im Schnitt kann mit einer positiven Ladung pro 1000 Da gerechnet werden. Durch dieses Phänomen können auch sehr große Proteine vermessen werden, da das m/z -Intervall des Massenanalysators dann nur ein kleines Massenfenster umfassen muss. Zusätzlich werden durch die verschiedenen Ladungszustände redundante Informationen über die molekulare Masse eines Proteins geliefert. Ein Nachteil von ESI ist die Unverträglichkeit der Methode mit Puffern, Salzen und Detergenzien. Aus diesem Grund wird diese Ionisierungstechnik in der Regel mit einer HPLC-Trennung und -Aufreinigung gekoppelt, mit deren Vorschaltung störende Reagenzien vor der MS-Messung entfernt werden können.

Wichtige Weiterentwicklungen sind mikro- und nano-ESI, bei denen die Flussrate stark reduziert ist und damit die Sensitivität verbessert wird [Emmett 1994; Wilm 1996].

1.3.3 MALDI

Die Technik der Laser Desorption/Ionisation ist schon lange bekannt, doch erst durch Kombination mit einer Matrix konnte sie zur Messung von Biomolekülen verwendet werden. Demnach ist MALDI eine Ionisierungsmethode, bei der durch Schüsse eines UV-Lasers in einen Matrixüberschuss eingebettete Proteine in intaktem Zustand als Ionen in die Gasphase überführt werden können [Karas 1985, 1988]. Sogar die Ionisation von intakten Proteinen mit Massen über 100 kDa kann mit Hilfe dieser Methode erfolgen [Karas 1989, 1991; Hillenkamp 1991, 2000].

Die Matrix besteht aus kleinen organischen Molekülen, die durch ihre aromatische Struktur UV-Strahlung stark absorbieren [Hillenkamp 1991] und die häufig als weitere gemeinsame Eigenschaft eine Säurefunktion haben. Die Matrix hat verschiedene Funktionen, ihre wichtigste Rolle ist Absorption der Laserenergie. Außerdem werden die einzelnen Proteinmoleküle durch den großen molaren Überschuss isoliert [Strupat 1991]. Die Wahl einer geeigneten Matrix ist daher ein wichtiger Schritt und von den zu untersuchenden Analyten abhängig [John 2006; Jones 2006]. Neben der Energieabsorption des Lasers sollte die Matrix folgende Eigenschaften erfüllen: sie sollte kompatibel mit den Lösungsmitteln des Analyten und vakuumstabil sein sowie die Kodesorption des Analyten bei Laserbeschuss bewirken. [Canas 2007]. Außerdem muss sie als Protonendonator im positiven, als -akzeptor im negativen Ionisierungsmodus wirken [Hillenkamp 1986]. In der Peptidanalytik und zur Messung kleiner Proteine wird am häufigsten α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA) eingesetzt [Beavis 1992]. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) eignet sich ebenfalls für die Messung von Peptiden [Strupat 1991]. Insbesondere Phosphopeptide können damit besser untersucht werden. Als neu entwickelte Matrix ist 4-Chlor- α -cyanozimtsäure zu nennen, die eine bessere Sensitivität für Peptidmessungen als CHCA ermöglicht [Jaskolla 2008]. Für die Analyse großer Proteine kommen häufig DHBs (9:1 Gemisch von DHB mit 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure) und Sinapinsäure zur Anwendung [Beavis 1989a; Bahr 1997]. Natürlich können auch andere Biomoleküle als Proteine mit MALDI vermessen werden. Zur Untersuchung von Oligonukleotiden wird beispielsweise 3-Hydroxypicolinsäure verwendet [Taranenko 1994].

Die Matrix-Proben-Präparation beeinflusst die Qualität der Massenspektren [Cohen 1996]. Im Allgemeinen wird die *Dried droplet*-Präparation verwendet, bei der Matrix- und Probenlösung gemischt und anschließend auf den MALDI-Probenteller punktförmig aufgetragen (Spotten) werden [Karas 1988]. Während der Trocknung bilden sich Kokristalle aus Matrix und Analyt. Mit dieser stabilen Präparation werden gute Ergebnisse für viele unterschiedliche Analyte erzielt. Neben diversen anderen Methoden ist noch die *Thin-Layer*-Technik zu erwähnen, bei der ein homogener Matrixfilm auf dem MALDI-Probenteller erzeugt und die Probe anschließend darauf aufgebracht wird [Vorm 1994]. Salzkontaminationen können die Kristallisation von Matrix und Probe beeinflussen und können durch Waschen des *Spots* mit eiskaltem Wasser oder 5% Ameisensäure entfernt werden. Eine andere Möglichkeit ist die zu analysierende Probe schon vor der Präparation aufzureinigen z.B. durch mit C18-Material gefüllte Pipettenspitzen (ZipTips®).

Die Probenpräparation, bestehend aus Matrix-Mikrokristallen mit inkorporierten isolierten Proteinmolekülen, wird im Vakuum mit einem gepulsten Laserstrahl (1-10 ns) beschossen. Typische UV-MALDI-Laserwellenlängen sind 337 nm eines Stickstofflasers oder 355 nm eines Nd:YAG-Lasers [Beavis 1989b]. Durch den Laserbeschuss wird eine dünne Schicht aus Matrix und Analyt abgetragen, es bildet sich eine Wolke aus partikulärem und gasförmigen Material (MALDI-*Plume*), die sich ins Vakuum ausbreitet. Da die Ionisation nicht ausschließlich von den sauren oder basischen Gruppen der zu untersuchenden Verbindung abhängt [Beavis 1990], muss die Wechselwirkung zwischen Matrixionen und Analyt hierfür verantwortlich sein. Der Ionisierungsprozess wird durch die kokristallisierte Matrix beeinflusst, die Protonen auf den Analyt transferiert. Eine geringe Protonenaffinität der Matrix bewirkt z.B. eine leichtere Protonierung des Analyten und bewirkt eine gute Ionisation [Jaskolla 2008].

Die physikochemischen Begebenheiten, die zum Transfer des Proteins in die Gasphase und zu ihrer Ionisation führen, sind bis heute noch nicht eindeutig aufgeklärt. Ein frühes Modell des Mechanismus geht davon aus, dass die obersten Schichten der Matrix einen Phasenübergang von fest in die Gasphase vollziehen. Die hieraus entstehende Ausdehnung der Matrixmoleküle ins Vakuum reißt die isolierten Proteinmoleküle mit in die Gasphase [Beavis 1991]. Während des Transfers in die Gasphase werden die Proteine durch Protonentransferreaktionen mit der Matrix ionisiert [Beavis 1992; Ehring 1992]. Ein weiteres Modellsystem ist das Clustermodell, bei dem postuliert wird, dass der Analyt in einem *Cluster* mit der Matrix desorbiert. Durch Wechselwirkungen mit der Matrix und durch verschiedene Prozesse wie Ladungstrennung oder Photoionisation werden die Probemoleküle ionisiert [Karas 2003]. Der Analyt kann auch mehrfach geladen vorliegen, wird jedoch wieder durch Protonen-/Elektronenübergänge in der Molekülwolke neutralisiert. Die übrigbleibenden, detektierten Ionen sind demnach die *Lucky survivors* dieses Neutralisationsprozesses [Karas 2000] und die erhaltenen Spektren zeigen demnach in der Regel einfach protonierte Signale, die gut zu interpretieren sind.

1.3.4 Massenanalysatoren

Im Proteomicsbereich sind folgende vier Massenanalysatoren am häufigsten vertreten: Quadrupole (Q), Ionenfallen (Quadrupol-Ionenfalle QIT, lineare Ionenfalle LIT), Flugzeit- (*time of flight*-TOF) Massenanalysatoren und magnetische oder elektrostatische Ionenfallen wie FTICR (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*) und Orbitrap.

Die Analysatoren trennen die Ionen z.B. aufgrund ihrer m/z - Resonanzfrequenz in Ionenfallen, ihrer m/z -Stabilität in hochfrequenten Quadrupolfeldern oder über ihre Flugzeit wie ein TOF. Jeder Massenanalysator hat spezifische Eigenschaften bezogen auf Massenbereich, Geschwindigkeit, Auflösung, Sensitivität, Ionentransmission oder dynamischer Bereich.

Eine Quadrupol-Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden. In der Mitte der Endkappen befinden sich kleine, zentrische Öffnungen zum Einlass sowie Auswurf der Ionen. Die generierten Ionen werden entsprechend ihrem m/z -Verhältnis auf bestimmten stabilen Bahnen, welche durch das Anlegen von Wechselspannungen an den Elektroden vorgegeben sind, innerhalb der Ionenfalle gehalten. Zur Detektion werden die Ionen durch das Anlegen eines zusätzlichen Wechselfeldes aus der Falle „herausgeworfen“ und auf einen Detektor geleitet. Die erste kommerzielle QIT (Finnigan Mat), die Ionen durch ein durch Radiofrequenz erzeugtes dreidimensionales, quadropolares elektrisches Feld fängt, wurde 1983 vorgestellt [Zhou 2008]. Durch die Entdeckung des massenselektiven axialen Instabilitätsscans konnte aus einem „Ionenfanggerät“ ein QIT-Massenspektrometer entwickelt werden, indem alle Ionen in einer bestimmten Periode in der Ionenfalle gefangen und nacheinander dem Detektor zugeführt werden konnten. Durch Heliumzufuhr in die Falle wurden zusätzlich Massenauflösung und Sensitivität verbessert [Stafford 1984].

FTICR-Instrumente sind viele Jahre nach ihrer Entwicklung [Comisarow 1974] durch Kopplung mit externen Ionenquellen zu hochauflösenden, genauen Massenspektrometern geworden [Senko 1997]. Durch die Kombination mit LITs oder *Triple*-Quadrupolen (QqQ) sind diese Geräte ein fester Bestandteil der Proteomicsforschung.

Die Kombination mit der gepulsten Ionenquelle MALDI erneuerte das Interesse an der TOF-Technologie [Price 1990]. Das Konzept der Trennung von Ionen in einem TOF-Analysator wurde schon 1948 veröffentlicht, aber erst später praktisch entwickelt [Cameron 1948; Wiley 1955]. Die Hauptcharakteristika des Flugzeit-Analysators sind die

schnelle Analysegeschwindigkeit, die Möglichkeit ein komplettes Massenspektrum mit einer einzigen Aufnahme zu detektieren, kein Größenlimit (in der Praxis jedoch durch die Effizienz des Detektors beschränkt) und die hohe Sensitivität [Liu 2007].

Die Differenz zwischen der Startzeit, die sich durch den Laserschuss definiert und für alle Ionen gleich ist, und der Ankunftszeit der separierten Ionenpakete am Detektor ist proportional zur Wurzel von m/z . Die kinetische Energie E_{kin} , die sich aus der Masse des Ions m und dem Quadrat der Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke v zusammensetzt, ist gleichzusetzen mit dem Produkt aus der Ladungszahl z , der Elementarladung e und der Beschleunigungsspannung U . Der Term v kann durch den Quotient aus der Länge der feldfreien Driftstrecke L und der Gesamtflugzeit t ersetzt werden. Löst man nach m/z auf wird deutlich, dass dieses Verhältnis proportional zum Quadrat der Flugzeit ist.

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} * m * v^2 = z * e * U$$

$$v = L/t$$

$$m/z = \frac{(2 * e * U)}{L^2} * t^2$$

Die molekulare Masse kann somit über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit bestimmt werden.

Alle Ionen werden durch eine festgelegte Potentialdifferenz auf eine definierte kinetische Energie von einigen kV beschleunigt. Die durch den Ionisationsprozess gebildeten Ionen passieren nach Verlassen der Quelle eine feldfreie Driftstrecke und teilen sich in räumlich getrennte Ionenpakete auf, die sich mit der jeweils charakteristischen Geschwindigkeit ihres m/z -Wertes bewegen. Der Detektor am Ende des Flugrohrs produziert ein Signal, wenn jedes einzelne Ionenpaket auftrifft (Abb. 1.9). Durch Auftragen des Signals als zeitabhängige Funktion erhält man ein TOF-Spektrum, das dazu verwendet werden kann, den spezifischen m/z -Wert des Ions zu berechnen.

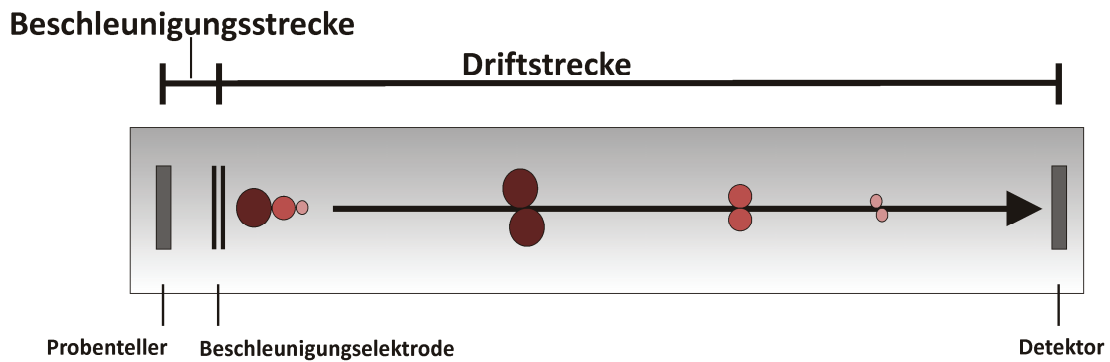


Abb. 1.9 Darstellung eines TOF-Massenanalysators

Schon Wiley und McLaren beschrieben, dass räumliche Unterschiede und Energiedifferenzen von Ionen die Auflösung im Flugzeit-MS beeinflussen. Auch beim MALDI-Prozess ist dies zu beobachten, so dass hierdurch die Sichtbarkeit der Isotopenverteilung kleinerer Peptide verhindert wird. Eine große Verteilung der Anfangsgeschwindigkeiten von Ionen limitiert zusätzlich die zu erreichende Massengenauigkeit [Zhou 1992].

Zwei standardisierte Verbesserungen, ein Ionenspiegel (Reflektor) und die verzögerte Extraktion (*delayed extraction* – DE) sind zur Behebung dieses Problems entwickelt worden. Der 1973 eingeführte Reflektor wird gegenüber der Ionenquelle am Ende des Flugrohrs platziert und dient dazu Flugzeitunterschiede, die Folge unterschiedlicher Ionenenergien sind, auszugleichen, was durch das Prinzip unterschiedlicher Eindringtiefen in das Reflektorfeld erreicht wird [Mamyrin 1973]. Der Reflektor lenkt die Ionen durch Anlegen einer Gegenspannung um nahezu 180° in Richtung des Detektors um. Ionen mit geringer kinetischer Energie dringen nicht so tief in den Reflektor ein wie die mit höherer kinetischer Energie, so dass der initiale Energieunterschied verringert wird. Durch die Einführung des Reflektors können erheblich bessere Auflösungen (bis zu 35.000 in einigen Bereichen des Spektrums) erzielt werden [Bergmann 1989]. Der zweite Ansatz ist die DE, deren Technik schon von Wiley und McLaren 1955 beschrieben und später zur Weiterentwicklung von MALDI wieder entdeckt wurde [Wiley 1955; Colby 1994; Vestal 1995]. Um die unterschiedlichen Anfangsgeschwindigkeiten der MALDI-Ionen zu nivellieren, werden die Ionen in einem feldfreien Bereich erzeugt. Es vergeht erst ein bestimmtes Zeitintervall von typisch einigen 100 ns, bevor eine beschleunigende Spannung angelegt wird. Dadurch wird erreicht, dass Ionen unterschiedlicher Anfangsgeschwindigkeit nicht auseinanderdriften, sondern sich am Ort des Detektors treffen. In einem linearen TOF-Instrument werden damit Massenauflösungen bis zu 4000

erreicht. Messungen von Peptiden mit Genauigkeiten, die im Mittel 30-50 ppm betragen, können mit DE im linearen Modus erzielt werden [Whittall 1995]. Kombiniert man dies DE-Technik noch mit dem oben beschriebenen Reflektor, kann die Auflösung weiter gesteigert werden [Vestal 1995; Brown 1995]. Heutzutage kann ein Auflösungsvermögen von 20000 mit vielen Geräten erzielt werden und die Massengenauigkeit liegt nach guter Kalibrierung oft im niedrigen ppm-Bereich [Domon 2006].

Hybrid-Instrumente wurden entwickelt, um die Vorteile verschiedener Analysatoren zu kombinieren wie Qq-TOF oder LIT-FTICR. Das Qq-TOF wurde 1984 entwickelt und die Ionenselektion sowie Tandem MS des QqQ-Instruments wurde mit der hohen Auflösung eines TOF-Analysators kombiniert [Glish 1984]. Während dieser Prototyp noch eine axiale Injektion von Qq ins Flugrohr hatte, wurde später eine wesentliche Verbesserung in Sensitivität und Auflösung durch orthogonale Injektion erzielt [Morris 1996; Guilhaus 2000]. Die orthogonale Beschleunigung von Ionen in ein TOF-MS [Dawson 1989] ermöglicht die Verbindung mit einer kontinuierlichen Ionenquelle wie ESI [Boyle 1992]. Ein Qq-oTOF MS kann Auflösungen von 15.000-20.000 in einem Single-Pass und mehr als 50.000 in einem Multipass-Instrument erzielen [Piyadasa 1999; Lewin 2002]. Bei Qq-oTOFs dient der Quadrupol bei MS-Messungen als *Ion guide* zum TOF-Analysator, in dem die Messung stattfindet. Im MS/MS-Modus wird das Vorläuferion (*Precursor*) im ersten Quadrupol selektiert, im zweiten dann fragmentiert und die Produktionen mittels TOF analysiert. Die gute Massengenauigkeit und Auflösung vereinfacht die Proteinidentifikation per Datenbanksuche, da die Suchparameter enger gewählt werden können und somit die Richtigkeit der Ergebnisse verifizieren.

Ein neuer Typ des Massenanalysators ist die von Makarov entwickelte Orbitrap [Makarov 2000]. Die gefangenen Ionen umkreisen eine spindelähnliche Elektrode und oszillieren entlang ihrer Achse mit der für ihre m/z -Werte charakteristischen Frequenz, die in ein Massenspektrum übertragen wird. Hierauf basiert ein neues Hybrid-Massenspektrometer, die LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) [Makarov 2006]. Diese besteht aus einer linearen Ionenfalle, die mit einer *C-Trap* und der Orbitrap gekoppelt ist und die Sensitivität und die MS/MS-Tauglichkeit einer LIT mit der hohen Massengenauigkeit und Auflösung der Orbitrap verbindet. Diese Eigenschaften haben sie zu einem wertvollen Gerät sowohl in Hochdurchsatz-*Bottom-up*- wie auch in *Top-Down*-Ansätzen gemacht [Yates 2006; Macek 2006]

1.3.5 *Peptide mass fingerprinting (PMF)*

Proteinidentifikation durch Massenspektrometrie kann über sequenzspezifische Peptidfragmentierung erfolgen oder über *peptide mass fingerprinting* (PMF). Die Auswertung der Daten erfolgt computerbasiert und ist aus der modernen MS nicht mehr wegzudenken. Schon 1966 wurde erstmals von Klaus Biemann und Mitarbeitern ein Computer zur Auswertung von MS-Daten für die Ermittlung der Aminosäuresequenz eines Oligopeptids verwendet [Biemann 1966]. Auch andere Arbeitsgruppen nutzten damals schon das neue Hilfsmittel zur Spektreninterpretation [Barber 1966; Senn 1966].

Für PMF-Analytik werden die Proteine, nachdem sie über Gelelektrophorese oder chromatographisch aufgetrennt worden sind, proteolytisch gespalten. Da jedes Protein individuelle Peptide produziert, kann von einem spezifischen Fingerabdruck ausgegangen werden, der für jedes Protein einzigartig ist. MALDI MS bildet in den meisten Fällen die Grundlage für PMF-Suchen [Gevaert 2000; Henzel 2003], da durch die Bildung von einfach protonierten Signalen die PMF-Auswertung stark vereinfacht wird.

Die per MS bestimmten molekularen Massen der generierten Peptide werden danach mit theoretischen Peptidmassen von in Datenbanken gespeicherten Proteinen verglichen. Dies geschieht mit Hilfe eines Suchalgorithmus. Hierdurch kann ein Protein signifikant identifiziert werden. Dieses Prinzip wurde in einigen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entwickelt [Henzel 1993; James 1993; Yates 1993; Pappin 1997].

Einen Nachteil hat die Suche, wenn zu komplexe Proteinmischungen verdaut werden, da eine Peptidmasse dann nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden kann. Aus diesem Grund wird eine PMF-Suche häufig an ein 2D-Experiment angeschlossen, bei dem eine Mischung in der Regel so aufgetrennt wird, dass in einer detektierten Probe nur ein Protein zu finden ist. Außerdem können hierbei erhaltene Informationen wie molare Masse oder isoelektrischer Punkt bei der Identifizierung hilfreich sein [Aebersold 2001]. Natürlich muss auch eine Datenbank verwendet werden, die die komplette Aminosäuresequenz und evtl. Homologe oder Spleißvarianten des zu identifizierenden Proteins enthält, da bruchstückhafte Daten eine eindeutige Zuordnung unmöglich machen [Cordwell 1995].

Bei Durchführung einer Suche wird häufig beobachtet, dass nicht alle der theoretischen Massen auch experimentell nachgewiesen werden. Dies kann durch schlechte Löslichkeit, Adsorption, selektive Ionisation der Peptide oder biologische Variationen hervorgerufen

werden. Mangelnde Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat ist im nativen Zustand durch die dreidimensionale Struktur gegeben. Besonders im Fall der Membranproteine kann dies auch ein Grund für mangelnde Identifizierung sein. Auch der umgekehrte Fall, dass viele gemessene Peptidmassen nicht zu den vorhergesagten Werten der Liste passen, tritt häufig auf und ist ein Grund für falschpositive oder negative Resultate. Gründe sind posttranslationale oder artifizielle Modifikationen, überlesene Schnittstellen, unerwartete Peptide durch nichtspezifische Schnitte oder Proteinverunreinigungen wie Keratin [Jensen 1997; Eriksson 2000]. Diese müssen dann, wenn bekannt, in der Datenbanksuche berücksichtigt werden.

Ein wichtiger Parameter zur Identifizierung per PMF ist die Massengenauigkeit der massenspektrometrischen Messung [Fenyo 1998; Clauser 1999], mit deren Zunahme sich auch die Aussagekraft des *Scores* erhöht [Takach 1997; Bruce 1999]. Sie kann durch interne Nachkalibrierung auf bekannte Signale im Spektrum wie autoproteolytische Enzympeaks oder vorher zugefügte Peptide verbessert werden. Nach der Aufnahme eines Spektrums müssen die monoisotopischen Signale erkannt und markiert werden. Der Erfolg dieser Prozedur beruht auf der Auflösung des Isotopenclusters. Die Erkennung des monoisotopischen Signals wird in der Regel durch die zugehörige Geräte- oder Auswertesoftware übernommen, kann aber auch noch manuell erfolgen. Welche Signale zur Datenbanksuche hinzugezogen werden, kann über das Merkmal des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/N) vorgegeben werden.

Mit der Hilfe von Suchalgorithmen wie Mascot, MS-Fit oder Sequest [Perkins 1999; Clauser 1999; Eng 1994] kann eine Datenbanksuche und somit eine Identifizierung des Proteins durchgeführt werden. Anhand von Mascot soll dies kurz erläutert werden. Eine Peptidmassenliste oder eine mgf-Datei (*mascot generic file*) wird gegen eine gängige Datenbank wie NCBI nr oder Swissprot/TrEMBL abgeglichen. Verschiedene Parameter u.a. Taxonomie, verwendetes Enzym oder Modifikationen können berücksichtigt werden, ebenso die erforderte Massengenauigkeit. Mascot berechnet die Wahrscheinlichkeit eines richtigen Ergebnisses über den MOWSE (*molecular weight search*)-Score [Pappin 1993], mit dessen Hilfe die Qualität der Suche festgelegt und eine Rangliste verschiedener Treffer erstellt werden kann. Nur wenn der Wert des *Scores* über einem definierten Signifikanz-Schwellenwert liegt, ist das Resultat als positive Identifikation zu bewerten. Um die Richtigkeit des Ergebnisses zu kontrollieren, kann manuell überprüft werden, ob das intensivste Signal zu dem identifizierten Protein gehört. Oft handelt es sich dabei um

argininhaltige Peptide [Krause 1999]. Nicht zugeordnete Signale sind oft auf unerwarteten Modifikationen wie Tryptophanoxidationen und Methylierungen oder vermehrte überlesene Schnittstellen zurückzuführen [Thiede 2000; Haebel 1998]. Außerdem ist es möglich über die Suche gegen eine *Decoy*-Datenbank, die Menge falschpositiver Identifizierungen zu ermitteln.

1.3.6 Fragmentierungstechniken

Früher konnte die Aminosäurezusammensetzung eines Peptids nur über die Edman-Sequenzierung bestimmt werden [Edman 1967]. Heutzutage wird dazu die massenspektrometrische Analyse nach Fragmentierung des Peptids im sogenannten MS/MS-Modus verwendet. Durch Anregung der massenselektierten Ionen z.B. durch Stöße mit Edelgasatomen (CID, siehe unten) kommt es zu einer sequenzabhängigen Spaltung des Peptidrückgrades, so dass für jedes Peptid ein charakteristisches Fragmentenmuster erhalten wird, das Rückschlüsse auf die Primärstruktur erlaubt. MS/MS Daten erhöhen somit deutlich die Selektivität des Massenspektrums, so dass auch bei einer geringeren Massenbestimmungsrichtigkeit der intakten Peptide eindeutige Zuordnungen zu Datenbank-Peptiden möglich werden. Auch PTMs können auf diese Weise bestätigt und lokalisiert werden. Die Aminosäuresequenz eines Peptids ist für die Proteinidentifizierung somit aussagekräftiger als die Masse einzelner Peptide, da sie für ein bestimmtes Protein einzigartig ist [Zubarev 1996]. Für großflächige *Proteomics*-Ansätze ist der Proteinnachweis demnach sehr von der Tandem-Massenspektrometrie abhängig, durch die sequenzspezifische Peptidspektren erhalten werden können. Mittlerweile gibt es automatische, Instrument-kontrollierte Auswahlssysteme für Vorläuferionen, die auf dem *Full-Scan*-Massenspektrum basieren. Meistens werden die intensivsten Signale für weitere Fragmentierungen herangezogen [Figeys 1999; Ducret 1998]. Die am häufigsten eingesetzte Fragmentierungstechnik in *Proteomics* ist die kollisionsinduzierte Dissoziation CID (*collision-induced dissociation*). Fragmentspektren werden erhalten, indem das gewählte Protein- oder Peptidion, auch *Precursor* genannt, zuerst isoliert und dann in einer Zelle durch Kollisionen mit neutralen Gasatomen angeregt wird. Dies führt zu Brüchen der Molekülbindungen. Peptidfragmentierungen können per *low-energy* CID sowohl in QqQ, Ionenfallen oder Qq-oTOFs durchgeführt oder durch MALDI-*Post source decay* (PSD) erzeugt werden [Davis 1997; Borchers 1999; Spengler 1992].

Obwohl MALDI im Prinzip eine sanfte Ionisierungstechnik ist, werden während des Ionisierungsprozesses trotzdem zu einem gewissen Grad metastabile Ionen erzeugt. Proteine und Peptide zeigen dann Neutralverluste und ihre Amidbindungen brechen. Bei PSD geschieht dies über einen vergleichsweise längeren Zeitraum (μs) in der feldfreien Region während der Extraktion aus der Quelle [Kaufmann 1993]. Für dieses Phänomen könnten sowohl überschüssige Laserenergie als auch kollisionsinduzierte Aktivierung in der dichten Materialwolke zu Beginn der Ionenextraktion verantwortlich sein [Gevaert 2000]. MALDI-PSD kann nur wenig kontrolliert durchgeführt werden, da nur einige Parameter wie die verwendete Matrix oder die Laserenergie verändert werden können. Da PSD im feldfreien Bereich auftritt, behalten Fragmentionen die Geschwindigkeit ihres Vorläuferions bei und können deshalb nur bei Einsatz eines Reflektors von diesem getrennt werden. Ein *Timed Ion Selector* (TIS) wird zur *Precursor*-Auswahl verwendet. Da konventionelle Reflektoren nur eine begrenzte Energie-Fokussierung besitzen, ist es nicht möglich den Massenbereich aller Fragmente gleichzeitig zu fokussieren und aufzulösen. Dies kann durch den Einsatz eines *curved-field*-Reflektors [Cornish 1994] behoben werden. Eine andere Möglichkeit ist die Kombination von zwei TOF-Massenanalysatoren, die mit Hilfe einer Kollisionszelle gekoppelt werden. Dieser Aufbau kombiniert die Vorteile von MALDI wie hohe Sensitivität für die Peptidanalyse mit *high-energy* CID, so dass sowohl MS als auch MS/MS-Ionen mit hoher Auflösung und Massengenauigkeit erfasst werden können [Medzihradszky 2000]. In kommerziellen TOF/TOF-Instrumenten, wie in dem in dieser Arbeit verwendeten *4800 TOF/TOF Analyzer*TM werden *Precursor*-Ionen von ca. 8 kV auf 1 oder 2 kV durch eine verzögernde Linse abgebremst. Die Massen der Vorläuferionen werden durch einen aus einer dualen Ablenkplatte bestehenden TIS ausgewählt und dann in einer Kollisionszelle bei 1 bzw. 2 kV fragmentiert. Die Fragmentionen werden in einer zweiten Quelle wiederbeschleunigt und durch gepulste Extraktion fokussiert [Medzihradszky 2000; Yergey 2002; Suckau 2003]. In diesem Gerät gibt es zusätzlich noch einen *Metastable ion supressor* (MIS), der vor dem Reflektor sitzt und das Vorläuferion sowie die nicht beschleunigten Fragmente von der Analyse ausschließt (Abb. 1.10).

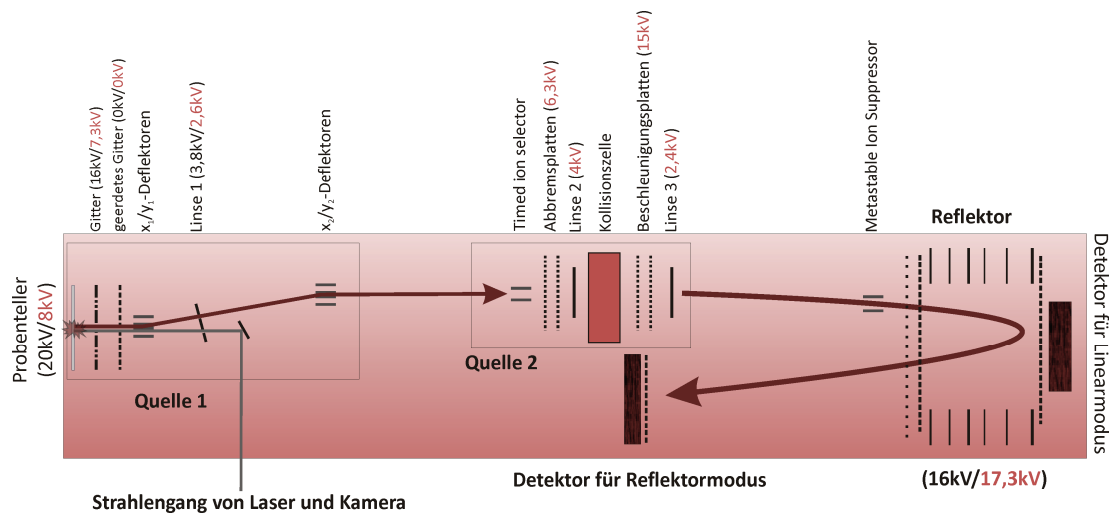


Abb. 1.10 Schematische Darstellung des 4800 TOF/TOF™ Analyzers

Aufbau des Massenspektrometers nach Produkt-Broschüre von Applied Biosystems. Zahlen in Klammern geben die Spannung während einer MS- (schwarz) oder 1 kV-MS/MS-Messung (rot) an

Durch *low energy*-Fragmentierung entstandene MS/MS-Spektren werden in der Regel von Fragmenten dominiert, die durch Spaltung der Peptidbindung hervorgerufen werden. Um resultierenden Fragmente besser beschreiben zu können, wurde eine Nomenklatur eingeführt, die neben der Schnittstelle in der Peptidbindung angibt, ob das Bruchstück den N- oder C-Terminus des Peptids enthält (Abb. 1.11) [Biemann 1990; Roepstorff 1984]. Da am häufigsten die Peptidbindungen gespalten werden, entstehen vermehrt b- und y-Ionen-Serien. Bei PSD/*high-energy* CID werden verstärkt Fragmente detektiert, die durch Ammoniak-, Wasser- oder Kohlenmonoxidabspaltung entstehen. Immoniumionen und interne Fragmente ohne N- oder C-Terminus sind ebenfalls keine Seltenheit, so dass die Methode aufgrund der entstehenden Spektrenkomplexität für große Peptide und intakte Proteine nicht gut geeignet ist [Han 2008].

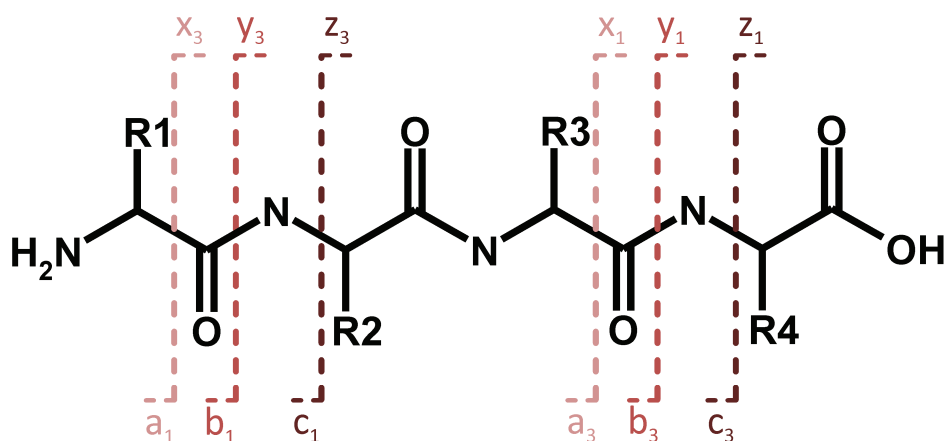


Abb. 1.11 Nomenklatur von MS/MS-Fragmenten nach Roepstorff

Eine andere ausschließlich den FTICR-Instrumenten vorbehaltene Fragmentierungstechnik ist die von der Arbeitsgruppe von McLafferty eingeführte ECD (*electron-capture dissociation*) [Zubarev 1998]. Ein thermisches Elektron wird durch ein mehrfach protoniertes Peptid/Protein eingefangen, wodurch eine Spaltung an N-C α -Bindungen induziert wird, so dass c- und z-Fragmentionen entstehen. Da labile PTMs bei dieser Methode erhalten bleiben, wird sie überwiegend bei *Top-Down*-Analysen eingesetzt [Ge 2002; Zabrouskov 2007].

Die analoge Technologie in Ionenfallen ist ETD (*electron-transfer dissociation*), bei der der Elektronentransfer durch radikalische Anionen mit niedriger Elektronenaffinität erfolgt. Sie hat den Vorteil, dass sie durch Ionen/Ionenreaktionen effizient und schnell ist und somit auch *online* nach chromatographischen Trennungen eingesetzt werden kann [Syka 2004; Chi 2007]. Sie gilt als komplementäre Technik zu CID bei *Proteomics*-Anwendungen [Good 2007].

Die Qualität eines Spektrums und damit die Möglichkeit der Zuordnung von Signalen zu einer Peptidsequenz ist abhängig von der Aminosäureabfolge, der Basizität und der Struktur ihrer Seitenketten sowie der Ladung des Peptids [Aebersold 2001]. Redundante Fragmentationen liefern viele sequenzspezifische Informationen, erschweren aber auch die Interpretation der Sequenz. Wenn die Aminosäuresequenz bekannt ist, ist die Berechnung der molaren Masse dieser Fragmente unproblematisch. Die *de-novo*-Interpretation eines CID-Spektrums leidet jedoch unter grundlegenden Problemen, denn es ist kaum vorherzusagen, ob ein Fragment b- oder y-Ion darstellt. Somit stellt die Deutung einer Peptidsequenz aus einem Spektrum heraus immer noch eine Herausforderung dar.

Die Datenbanksuche von MS/MS-Daten ist mit der PMF-Suche vergleichbar. Wie auch beim PMF wird die Masse des Vorläuferpeptids mit den theoretischen Werten der Datenbank innerhalb der festgelegten Parameter verglichen. Für die in Frage kommenden Peptide werden die theoretischen Fragmente berechnet und den gemessenen Massen gegenübergestellt. Für diesen Abgleich kann ebenfalls eine Massentoleranz ausgewählt werden. Außerdem kann durch die Festlegung des Gerätetyps die Erzeugung spezifischer Fragmente berücksichtigt werden. Übersteigt der durch Mascot-berechnete *Ion Score* einen gewissen Signifikanzschwellenwert ist das Ergebnis als positiv zu bewerten. Seit 2005 gelten die von *Molecular & Cellular Proteomics*-festgelegten Richtlinien für die Publikation von *Proteomics*-Experimenten, die eine sichere Proteinidentifizierung erst ab dem Nachweis von zwei sich nicht überschneidenden Peptiden als gesichert ansehen.

1.4 Quantifizierungstechniken

In der Proteomforschung werden häufig nicht nur Identifizierungs-, sondern auch Quantifizierungsfragen über die Proteinexpression gestellt, um beispielsweise Krankheitsmechanismen zu verstehen und *Biomarker* zu charakterisieren. Es gibt verschiedene Methoden zur Quantifizierung.

1997 kombinierten Unlu und Mitarbeiter zwei Methoden und entwickelten hieraus die *differential gel electrophoresis* (DIGE)-Technologie, die quantitative *Proteomics*-Studien von maximal drei Proben gleichzeitig ermöglicht [Unlu 1997]. Proteine verschiedener Ausgangsproben werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern kovalent gebunden und dann über das gleiche Gel per 2D-PAGE separiert. Da die Farbstoffe getrennt voneinander detektiert werden können, sind die Generierung und der differentielle Vergleich probenspezifischer Proteinmuster möglich. DIGE ist eine sensitive Methode, die eine lineare Detektion über einen dynamischen Bereich von 10^4 ermöglicht [Lilley 2002; Viswanathan 2006]. Allerdings sind die Experimente kostspielig und die eingesetzten Farbstoffe beeinflussen durch ihre kovalente Bindung die genaue Massendetektion der Proteine.

Allgemein angewandte Alternativen sind MS-basierte Quantifizierungsmethoden. Dabei werden meist stabile Isotope zur differentiellen Markierung verwendet. Die Kontrolle wird mit einem natürlich vorkommenden leichten Isotop markiert, während die Probe mit einem schweren Isotop versehen wird (oder umgekehrt). Beide werden danach in gleichem Verhältnis gemischt und die relativen Signale jedes Peptids mittels MS bestimmt. Die Quantifizierung kann durch Vergleich von Signalintensität oder integrierten Peakflächen mit Hilfe weiterer statistischer Parameter vorgenommen werden. Isotopenmarkierungen können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Eine chemische Markierung durch Isotope wird durch Reaktion der Probe mit einer chemischen Verbindung z. B. *isotope coded affinity tag* (ICAT) erzeugt [Gygi 1999; Goodlett 2001]. ICAT reagiert ausschließlich mit SH-Gruppen, so dass nur Cystein-enthaltende Peptide markiert werden. Diese können dann über Biotin angereichert werden, was die Komplexität der zu untersuchenden Peptidmischung um den Faktor 10 reduziert. Problematisch ist das Reagenz aber, wenn Proteine mit geringem oder keinem Cysteinanteil vorliegen.

Metabolische Markierungen (*stable isotope labeling in culture* - SILAC) werden in Zellkulturen durchgeführt [Oda 1999; Ong 2002]. Aminosäuren wie Lysin und/oder Arginin, die ein ^{12}C - oder ^{13}C - Isotop enthalten, werden in Proteine eingebaut. Nach einer tryptischen Proteolyse sollten somit alle Peptide komplett markiert und quantifizierbar sein. Diese Technik ist jedoch ausschließlich in Zellkulturen einsetzbar und erfordert einen sorgfältigen Versuchsaufbau. Bei enzymatischen Markierungen werden ^{18}O -Atome an der C-terminalen Seite von gespaltenen Peptiden eingeführt [Yao 2001]. Diese Methode hat den Vorteil einer generellen und sequenzunabhängigen Markierung, funktioniert auch bei geringer Probenmenge und kann mittlerweile auch vom Verdauungsschritt abgekoppelt werden [Lopez-Ferrer 2006]. Da markierte und nicht-markierte Peptide im einfachsten Fall nur eine Massendifferenz von 4 Da zeigen, kann es jedoch schwierig werden, die Pärchen zu unterscheiden, vor allem wenn sie mehrfach geladen sind und ein nicht-hochauflösendes Massenspektrometer verwendet wird [Kirkpatrick 2005].

MS/MS-basierte Quantifizierungsreagenzien wie iTRAQ (*isobaric mass tags for relative and absolute quantitation*) und TMT (*tandem mass tags*) reagieren als NHS-Ester quantitativ mit primären Aminogruppen. Jedes Peptid kann mit bis zu acht verschiedenen Tags markiert werden, die in den Fragmentspektren unterschiedliche Reporterionen erzeugen [Ross 2004; Choe 2007; van Ulsen 2009]. Da die Reagenzien durch Ausgleichgruppen alle isobar sind, ist die quantitative Information über sämtliche zu vergleichenden Peptide in einem MS/MS-Spektrum enthalten und deshalb weniger fehleranfällig.

Es gibt auch *Label*-freie Methoden, die auf dem Verhältnis der relativen Proteinmenge und Probenstatistik wie Sequenzabdeckung und *Peptide Count* beruhen [Wiener 2004; Higgs 2005]. Diese Methodik kann jedoch nur angewendet werden, wenn die Ergebnisse durch einen gut reproduzierbaren Arbeitslauf statistisch signifikant sind.

Die Elementmassenspektrometrie, genauer gesagt die ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) ermöglicht ebenfalls eine quantitative Analyse. Es können z.B. durch die Untersuchung von elementarem Phosphor die Phosphorylierungen eines Proteins bestimmt werden [Pereira Navaza 2007].

Insgesamt befindet sich das Feld der quantitativen *Proteomics* immer noch in der Entwicklung. In der Regel, müssen verschiedene Strategien genutzt und die Resultate kombiniert werden, um gute Ergebnisse zu erzielen [Canas 2007].

2. Zielsetzung

Im Bereich der Proteomanalyse ist die Gelelektrophorese eine der meistgenutzten Auftrennungstechniken. Um die separierten Proteine der Massenspektrometrie zugänglich zu machen, werden sie klassischerweise im Gel proteolytisch gespalten und anschließend die entstehenden Peptide extrahiert und per MS analysiert. Der in-Gel Verdau unterliegt vielen Schritten, so dass ein Verlust an Probe wahrscheinlich und damit die massenspektrometrische Analyse erschwert ist. Optimierungen des Verdauprotokolls im Hinblick auf Zeit, Lösemittel etc. wurden in verschiedenen Arbeiten schon unternommen. Es ist jedoch noch kein Ansatz bekannt, bei dem das Gelsystem selbst verändert wurde, obwohl es als physikalische Hürde eine optimale Proteaseaufnahme und Peptidextraktion verhindert. Das Ziel dieser Arbeit ist ein Gelsystem zu entwickeln, das bei einem gelbasierten *Proteomics*-Experiment Vorteile besitzt und somit eine bessere Identifizierung der Proteine ermöglicht.

Die in der klassischen Gelelektrophorese verwendeten Polyacrylamidgels bestehen aus langkettigen Acrylamidketten, die in der Regel mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid (MBA) quervernetzt werden und somit eine dreidimensionale Struktur ausbilden.

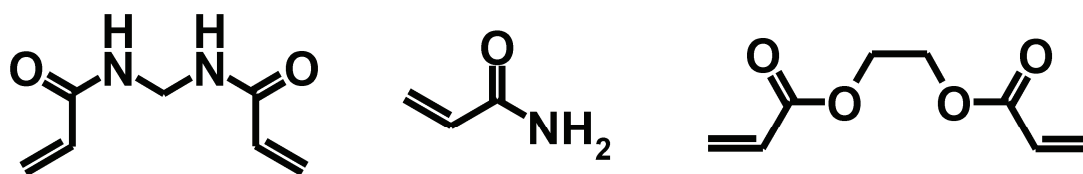


Abb. 2.1 Monomere zur Herstellung eines Polyacrylamidgels

Strukturformeln von links nach rechts: MBA, Acrylamid und EDA

Andere Substanzen wie beispielsweise Ethylenglykoldiacrylat (EDA) oder *N,N'*-1,2-dihydroxyethylenbisacrylamid zur Verknüpfung der linearen Acrylamidfilamente sind zwar bekannt, werden aber heutzutage nicht mehr eingesetzt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass durch chemische Spaltung die Quervernetzung wieder getrennt werden kann. Im Fall des EDAs können die Verknüpfungen durch den *Crosslinker* gelöst werden, indem die Esterbindungen innerhalb des Vernetzers durch basische Hydrolyse gespalten werden. Die zurückbleibenden Acrylamidfäden führen jedoch zu einer dickflüssigen Lösung, die sowohl für den proteolytischen Verdau als auch die anschließenden MS-Messungen ungeeignet ist (siehe Dissertation Björn Meyer). Aus diesem Grund sollen Gele mit gemischten *Crosslinkern* hergestellt werden. Durch die Kombination der beiden Quervernetzer EDA und MBA sollte ein aufweitbares Gel entstehen, d.h. dass die Poren innerhalb des Gels durch die EDA-Spaltung größer werden, aber die dreidimensionale Grundstruktur des Gels durch das nicht gespaltene MBA erhalten bleibt (Abb. 2.2).

Eine Aufweitung der Poren innerhalb des Gels durch partielle Spaltung der *Crosslinker*-Struktur stellt somit einen naheliegenden Ansatz dar, um das Problem der eingeschränkten Zugänglichkeit des Enzyms zu beheben und die Peptidextraktion zu verbessern.

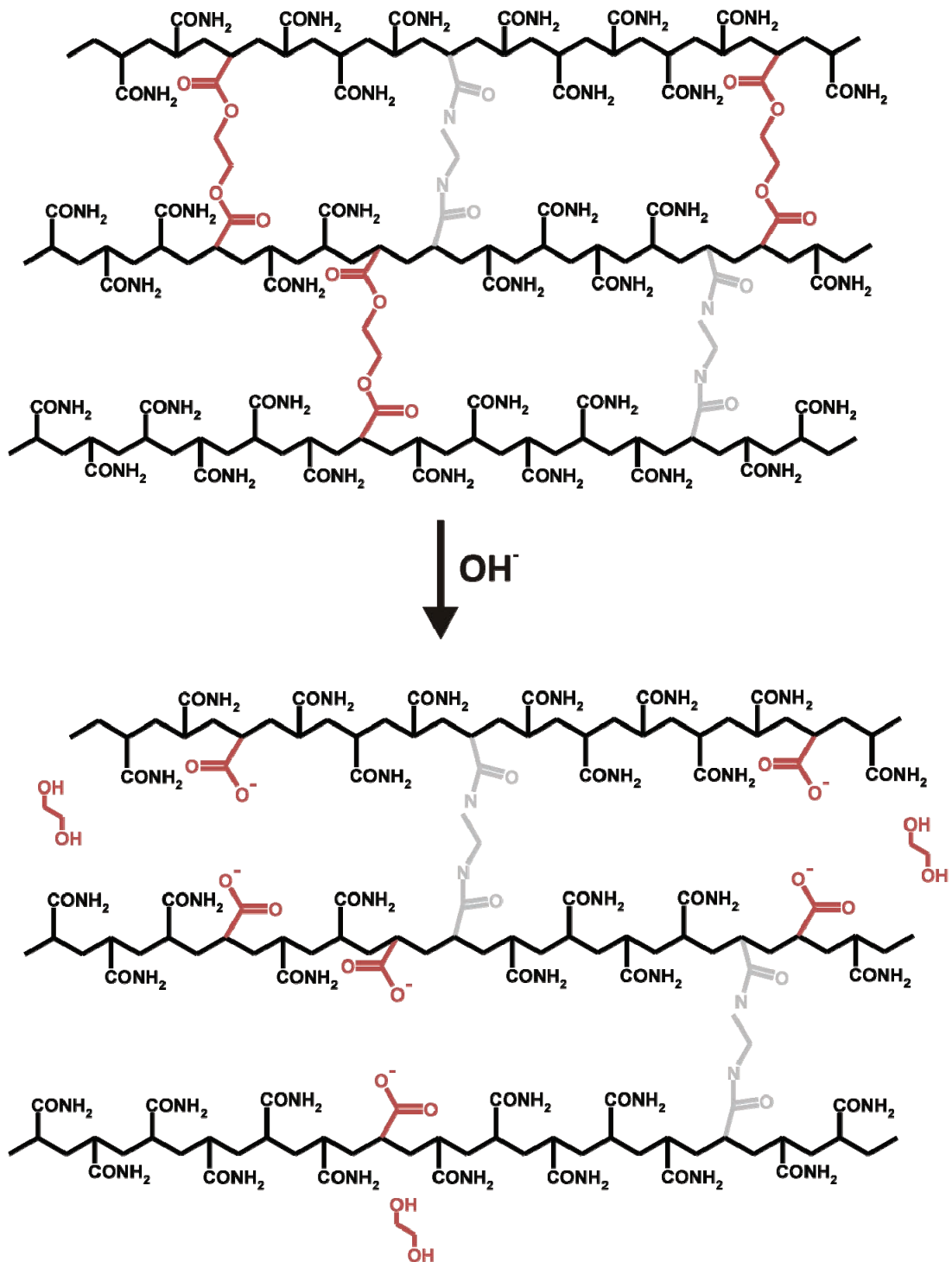


Abb. 2.2 Skizzierung der basischen Hydrolyse eines Gels mit gemischten Crosslinkern

Oben: MBA (grau) und EDA (rot) verknüpfen die Polyacrylamidfäden zu einer dreidimensionalen Struktur
 unten: nach der Zugabe einer starken Base wird die Estergruppe des EDAs gespalten. Als Nebenprodukt entsteht Ethylenglykol

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Tab. 3.1 Kommerziell erhältliche Reagenzien

Folgende Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Reagenz	Hersteller, Firmensitz
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniak konz.	Fluka (Sigma Aldrich), Steinheim
Ammoniumbicarbonat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CHAPS	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma Aldrich, Steinheim
DeStreak	GE Healthcare, München
Dithiothreitol	Sigma Aldrich, Steinheim
Dodecyl- β -Maltosid	GLYCON, Luckenwalde
EDA 90%	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylviolett	Fluka (Sigma Aldrich), Steinheim
Formaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma Aldrich, Steinheim
IPG Pharmalyte	GE Healthcare, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Lumitein	Biotium, Hayward, USA
MBA	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge 5M	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraffinöl, dünnflüssig	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%	Sigma Aldrich, Steinheim
Rotiphoese 30 (30% Acrylamid/0,8% MBA)	Roth, Karlsruhe
Rotiphoese A (30% Acrylamid)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure konz.	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe

Reagenz	Hersteller, Firmensitz
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Fluka (Sigma Aldrich), Steinheim
Tricin	Fluka (Sigma Aldrich), Steinheim
Trifluoressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Zincon	Sigma Aldrich, Steinheim

Falls nicht anders angegeben, entsprechen die Reagenzien der höchsten Reinheitsklasse. Das für alle Versuche verwendete demineralisierte Wasser wurde zusätzlich über eine MilliQ-Anlage der Firma Millipore (Schwalbach, Deutschland) deionisiert (Widerstand 18,2 mΩ/cm).

Tab. 3.2 Matrix, Proteine, Enzyme und Standards

Reagenzien	Hersteller, Firmensitz
Alkoholdehydrogenase (<i>S. cerevisiae</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Alpha-Amylase (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Carboanhydrase (<i>Bos taurus</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
CHCA	Bruker, Bremen
Elastase (<i>Sus scrofa</i>)	USB Corp., Cleveland, USA
Myoglobin (<i>Equus caballus</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin (<i>Sus scrofa</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Protein Calibrations Standard I	Bruker, Bremen
Purpurmembran (<i>Halobacterium salinarium</i>)	Actilor, Leuna
Sequazyme Peptide Mass Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
Serotransferrin (<i>Homo Sapiens</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Serumalbumin (<i>Bos Taurus/Homo sapiens</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin Proteomics Grade (<i>Sus scrofa</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Unstained Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München

Tab. 3.3 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller, Firmensitz
10 kDa Cutoff-Filter	Amicon, Beverly, USA
Einmal-Skalpell	Roth, Karlsruhe
Gelfiltrationssäule TSK 4000	Tosoh, Japan
Gelfiltrationssäule Superdex 200	GE Healthcare, München
IPG Streifen	GE Healthcare, München
Mikrotiterplatten, 96 well (PS)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mono Q HR 10/10-Säule	GE Healthcare, München G
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen, <i>Gel-Loader Tips</i>	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,65 ml & 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
ZipTips®C18	Millipore, Schwalbach

Tab. 3.4 Verwendete Geräte und Software

Gerät	Hersteller, Firmensitz
<i>3100 OFFGEL Fractionator</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>4800 MALDI TOF/TOF Analyzer</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Microfluidizer 100 LA	Microfluidics Corp., Newton, USA
Mikrowelle	Privileg, Quelle GmbH, Fürth
<i>Mini Protean 3 System</i>	Bio-Rad, München
<i>Power Pac 1000</i>	Bio-Rad, München
<i>ScanMaker i900</i>	Mikrotec, Evestar GmbH, Willich
<i>Sonorex Super RK 100 SH</i> Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Thermoschüttler <i>Thermostar</i>	Asys Hitech, Eugendorf, Österreich
Thermoschüttler <i>CAT SU26</i>	CAT, Staufen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
<i>Typhoon Scanner</i>	GE Healthcare, München
Vakuumzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
BioTools 2.2	Bruker Daltonics, Bremen
Data Explorer 4.9	Applied Biosystems, Darmstadt
ProtParam Tool (pI/GRAVY)	SIB, Lausanne, Schweiz
PyMOL 0.99rc3	DeLano Scientific, San Francisco, USA
TMHMM 2.0	TU Dänemark, Kopenhagen, Dänemark

3.2 Probenvorbereitung

3.2.1 Standardproteine, d2Ant-Komplex und Purpurmembran

1-3 mg der Standardproteine zur gelelektrophoretischen Trennung wurden je in 1 ml Wasser gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden die Proben 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Falls die Löslichkeit nicht ausreichte und Proteinrückstände zu erkennen waren, wurde ein neuer Ansatz hergestellt, indem das Protein in einer wässrigen 0,1% SDS-Lösung gelöst wurde. Anschließend wurde eine Stammlösung der Konzentration 1 pmol Protein/ μ l hergestellt, die je nach aufzutragender Proteinmenge verdünnt wurde. Der d2Ant-Komplex war ein Geschenk von Prof. Dr. Hermann Schägger (Goethe Universität, Frankfurt). Diesem Subkomplex der Cytochrom c-Reduktase (Rind) fehlen zwei Untereinheiten (siehe Kapitel 1.3). Das Sediment wurde in 1% SDS gelöst, so dass eine Gesamtkonzentration von 2,5 ng Protein/ μ l resultierte, die je nach Versuch angepasst wurde. Die Purpurmembran-Probe mit einem Bacteriorhodopsinanteil von ca. 90% wurde in Wasser suspendiert.

Vor der Gelelektrophorese wurde die jeweilige Probelösung im Verhältnis 1:1 mit 2-fach Probenpuffer (10 mM Tris/HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau) gemischt. Standardproteine wurden unter leichtem Schütteln (450 rpm) für 5 min bei 95 °C denaturiert, Gemische mit einem Anteil an Membranproteinen für 2 h bei 45 °C.

3.2.2 Cytosolische Extrakte von *Corynebacterium glutamicum*

Die cytosolischen Extrakte von *Corynebacterium glutamicum* DM 1803 wurden von Dr. Ansgar Pötsch (Ruhr Universität Bochum) zur Verfügung gestellt und waren nach dem Protokoll von [Schluesener 2005] aufgereinigt. Vor der IEF wurde die Probe, die 200 μ g Gesamtprotein enthielt, mit einem gleichen Volumen an 20% (w/v) TCA-Lösung bei 4°C für 30 min inkubiert, um die Proteine auszufällen und somit vorhandene Verunreinigungen wie z.B. Salze zu entfernen. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 13 000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde das entstandene Sediment zwei Mal mit eiskaltem Aceton bei -20°C für 5 min gewaschen.

3.2.3 Komplex I aus *Aquifex aeolicus*

Die Aufreinigung des Komplex I aus *Aquifex aeolicus* erfolgte wie in [Peng 2003] beschrieben. 40 g der tiefgefrorenen Zellen von *A. aeolicus* wurden in 200 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) resuspendiert und mit einem Microfluidizer 110 LA durch Druckeinwirkung von 1000 MPa zerstört. Nach 15-minütigem Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 10 000 g, wurden die Membranen bei 100 000 g für 1 h vom Überstand abgetrennt. Die Membranen wurden mit dem gleichen Puffer gewaschen und wieder aufgenommen, so dass eine ungefähre Proteinkonzentration von 12 mg/ml erhalten wurde. Nach Zugabe von Dodecyl- β -D-maltosid bis zu einer Endkonzentration von 3% (w/v) wurde die Suspension bei 40°C langsam für 1 h geschüttelt. Auch hiernach wurde wieder bei 100 000 g für 1 h zentrifugiert, um ungelöste Rückstände abzutrennen. Der Überstand wurde auf eine Mono Q HR 10/10-Säule gegeben, die mit dem 5-fachen Säulenvolumen an 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,05% Natriumazid, und 0,05% Dodecyl- β -D-maltosid voräquilibriert wurde. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl, pH 7,4, eluiert. Die Fraktionen, die Komplex I-Aktivität zeigten, wurden gesammelt, mit 10 kDa-Cutoff Filtern aufkonzentriert (ca. 5 mg/ml) und dann auf eine Gelfiltrationssäule geladen. Es wurde mit 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05% Natriumazid und 0,05% Dodecyl- β -D-maltosid eluiert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Diese Standardaufreinigung wie auch die Auftrennung der Untereinheiten mittels Gelelektrophorese wurden im Arbeitskreis von Hartmut Michel von Guohong Peng durchgeführt.

3.2.4 Proteingrößenmarker

Der für die Gelelektrophorese verwendete Proteingrößenmarker enthält 10 Proteine mit Molekulargewichten zwischen 250 kDa und 10 kD. Als Laufkontrolle für die SDS-PAGE wurden 6 μ l Marker pro Gelbande aufgetragen. Für die Sensitivitätsbestimmungen der Färbetechniken wurde er so verdünnt, dass finale Mengen im Bereich von 6-750 ng (50 kDa Protein) und 1-150 ng (100 & 20 kDa Protein) erhalten wurden.

3.3 SDS-PAGE

Da diese Arbeit hauptsächlich auf der Entwicklung eines neuen Gelsystems für die SDS-PAGE und deren Anwendbarkeit für die anschließende massenspektrometrische Analyse basiert, soll die Herstellung der Gele hier ausführlich beschrieben werden. Folgende Puffer wurden zum Gießen der Gele und für die elektrophoretische Trennung verwendet:

Tab. 3.5 Verwendete Puffer für die Protein-Trennung mit Tris-Glycin Gelen

Reagenz	Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer	Elektrodenpuffer
Tris	182 g	30,3 g	30,3 g
SDS	4 g	2 g	10 g
Glycin			144 g
Wasser	ad 1000 ml	ad 500 ml	ad 1000 ml
HCl (5M)	bis pH 8,8 erreicht ist	bis pH 6,8 erreicht ist	

Tab. 3.6 Verwendete Puffer für die Protein-Trennung mit Tris-Tricin Gelen

Reagenz	Gelpuffer (3 x)	Anodenpuffer (10 x)	Kathodenpuffer (10 x)
Tris	181,7 g	60,55 g	60,55 g
SDS	1,5 g		5 g
Tricin			89,6 g
Wasser	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml
HCl (5M)	bis pH 8,45 erreicht ist	bis pH 8,9 erreicht ist	

Die regulären Trenngele für die SDS-PAGE bestanden aus Acrylamid und wurden mit MBA vernetzt. Für diesen Zweck gibt es eine kommerziell erhältliche Standardlösung aus 30% Acrylamid und 0,8% MBA (T% variabel, C= 2,6%). Für die Entwicklung des neuen Gelsystems war es nötig, für das Gießen der Gele das gebräuchliche Gemisch durch eine Lösung zu ersetzen, die nur Acrylamid enthält und den *Crosslinker*-Anteil separat zuzugeben. Als Sammelgel wurde immer ein normales MBA-Gel mit T= 4% eingesetzt. Die Parameter für die Herstellung der Gele werden hier beispielhaft, sowohl für das Tris-Glycin- als auch für das Tris-Tricin-System und verschiedene Crosslinkermischungen dargestellt:

Tab. 3.7 Mengenangaben für zwei Tris-Glycin Trenngele (15 ml, Minigel-Ansatz)

Reagenz	MBA	EDA	MBA/EDA 0,5	ad MBA/EDA 0,5
T%/C%	14/2,6	14/2,6	14/2,6	15,34/3,85
Acrylamid/MBA-Lösung (30%/0,8%) [ml]	6,82			
Acrylamid (30%) [ml]		6,82	6,82	7,38
MBA [mg]			18,2	29,2
EDA, d= 1,094 g/ml, 90% [μl]		55,5	37	59,2
Trenngelpuffer (4 x) [ml]	3,75	3,75	3,75	3,75
Wasser [ml]	4,34	4,34	4,34	3,66
20% APS [μl]	75	75	75	75
TEMED [μl]	15	15	15	15

Tab. 3.8 Mengenangaben für zwei Tris-Glycin Sammelgele (10 ml, Minigel-Ansatz)

Reagenz	MBA
T%/C%	4/2,6
Acrylamid/MBA-Lösung (30%/0,8%) [ml]	1,3
Sammelgelpuffer (4 x) [ml]	2,5
Wasser [ml]	6,14
20% APS [μl]	50
TEMED [μl]	10

Tab. 3.9 Mengenangaben für zwei Tris-Tricin Trenngele (20 ml, Minigel-Ansatz)

Reagenz	MBA	EDA	MBA/EDA 0,5	ad MBA/EDA 0,5
T%/C%	16,5/2,6	16,5/2,6	16,5/2,6	18,38/3,79
Acrylamid/MBA-Lösung (30%/0,8%) [ml]	10,71			
Acrylamid (30%) [ml]		10,71	10,71	11,79
MBA [mg]			28,6	46,5
EDA, d= 1,094 g/ml, 90% [μl]			58	93
Gelpuffer (3 x) [ml]	6,67	6,67	6,67	6,67
Glycerin, d= 1,26 g/ml (ml)	1,59	1,59	1,59	1,59
Wasser [ml]	1,03	1,03	1,03	
20% APS [μl]	45	45	45	45
TEMED [μl]	9	9	9	9

Tab. 3.10 Mengenangaben für zwei Tris-Tricin Sammelgele (10 ml, Minigel-Ansatz)

Reagenz	MBA
T%/C%	4/2,6
Acrylamid/MBA-Lösung (30%/0,8%) [ml]	1,3
Gelpuffer (3 x) [ml]	3,34
Wasser [ml]	5,37
20% APS [µl]	50
TEMED [µl]	7,5

Zum Gießen der Minigele mit den Dimensionen 70 x 80 x 0,75 mm (Abb. 3.1A) wurde das Mini Protean 3-System von Bio-Rad verwendet. Die zusammengelegten Glasplatten wurden in den Gießstand gespannt (Abb. 3.1B). Für die Herstellung der Trenngele wurden die verschiedenen Reagenzien gemischt, zum Polymerisieren der Lösung APS und TEMED zugegeben und die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen.

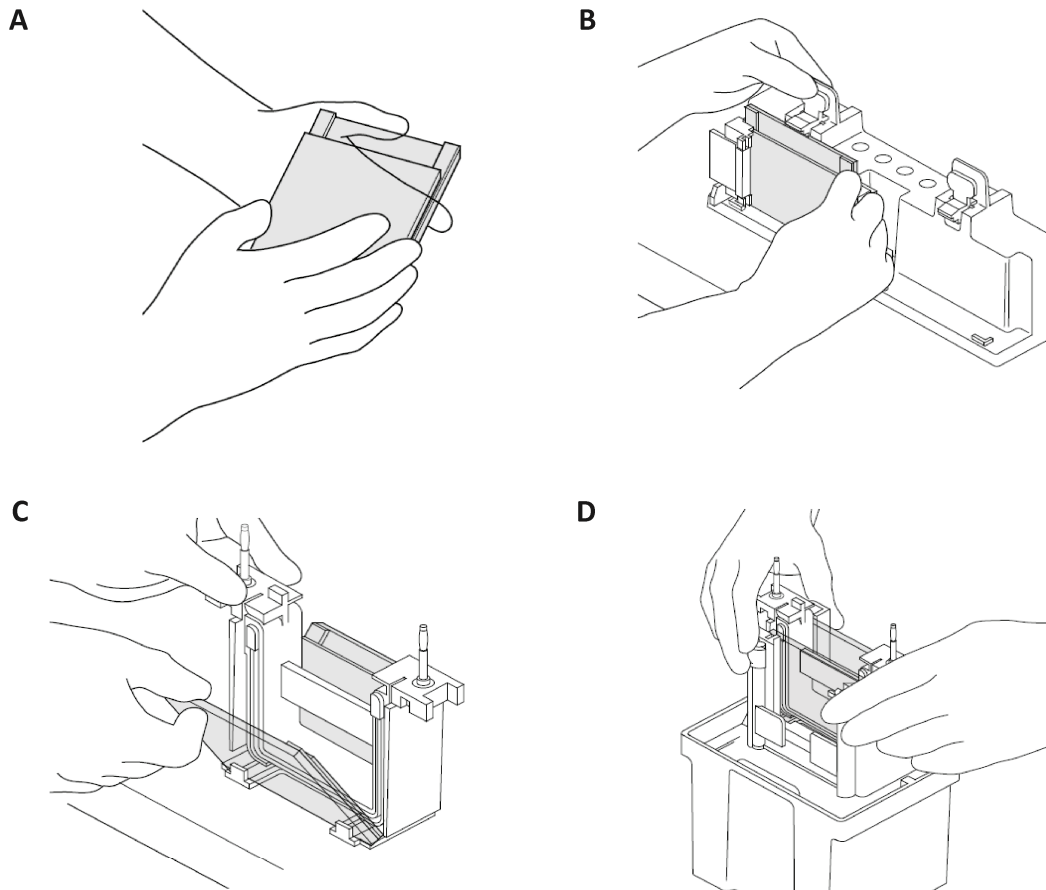


Abb. 3.1 Verwendung des Mini Protean 3-Systems

Vorbereitungen zur Durchführung einer SDS-PAGE mit Hilfe eines Mini-Protean 3-Systems. (A) Zusammensetzen der Glasplatten (B) Einsetzen der Glasplatten in den Gießstand (C) Einlegen der Gelplatten in die elektrophoretische Apparatur (D) Einsetzen in die Elektrophoresekammer Abbildungen sind dem „Mini Protean 3 Cell Assembly Guide“ (Bio-Rad, München) entnommen

Danach wurde die Oberfläche mit 0,1% SDS-Lösung überschichtet, um eine ebene Front zu erhalten. Nach 1 h wurde diese Lösung entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm, der die Ausbildung von Ladetaschen bewirkt, wurde in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Gele in feuchte Tücher und Klarsichtfolie gepackt, um sie über Nacht fertig auspolymerisieren zu lassen. Für die Gelelektrophorese wurden die Gelplatten in die elektrophoretische Apparatur gespannt und in die Kammer eingesetzt (Abb. 3.1C,D). Vor der Durchführung der SDS-PAGE wurden die Sammelgeltaschen mit einer 1:1-Mischung aus Probenpuffer und Proteinlösung beladen.

Bei Verwendung eines Tris-Glycin-Systems wurden sowohl in die kathodische als auch in die anodische Elektrophoresekammer der gleiche Elektrodenpuffer gefüllt. Die Gele wurden 15 min mit 10 mA pro Gel einlaufen gelassen, danach wurde der Wert auf 15 mA erhöht und für 50 min elektrophoretisch getrennt. Bei der Trennung mittels Tris-Tricin SDS-PAGE wurde Kathodenpuffer in die innere, Anodenpuffer in die äußere Kammer gefüllt. Als fixer Parameter wurden 15 mA pro Gel zum Einlaufen (15 min) und 35 mA für die 2-stündige Trennung gewählt.

3.4 2D-IEF/SDS-PAGE

Zur Auftrennung und Reinigung komplexer Proteingemische wird in vielen Fällen eine zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Der erste Schritt dieser Methode ist die IEF, d.h. die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt. Hierfür wurden kommerziell erhältliche IPG-Gelstreifen verwendet. IPG-Gele sind auf einem Plastikträger fixiert und können mit unterschiedlichen pH-Bereichen erworben werden. In diesem Fall wurden Streifen mit dem pH-Bereich 4-7 und NL (nicht-linear) 3-5,6 verwendet, da der cytosolische Extrakt von *Corynebacterium glutamicum* einen hohen Anteil an sauren Proteinen aufweist. Da mit einem Minigel-System gearbeitet wurde, wurden Streifen mit einer Länge von 7 cm verwendet.

Bei der IEF gibt es zwei Möglichkeiten des Probenauftrags: das *Cup-* sowie das *Rehydration-Loading*. Hier soll jedoch nur auf das in dieser Arbeit verwendete *Rehydration-Loading* näher eingegangen werden, da nach dem ebenfalls ausgetesteten *Cuploading* kein vollständiger Übergang der Probe von der ersten in die zweite Dimension erhalten wurde (Abb. 3.2).

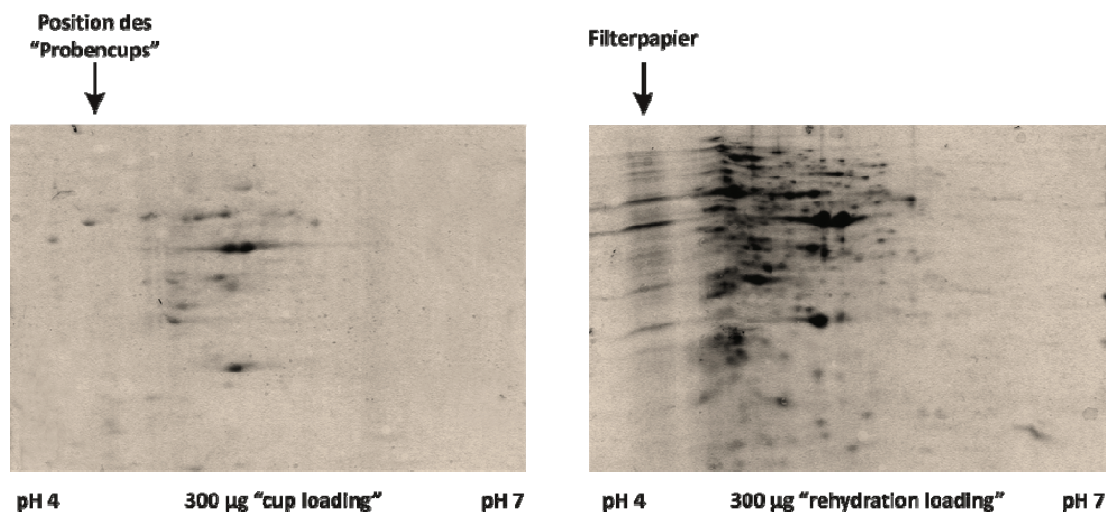


Abb. 3.2 Vergleich zwischen Cup- und Rehydrationloading (Beispiel)

Das Sediment der zuvor gefällten Probe wurde mit Hilfe eines Ultraschallbads in 125 µl Rehydrierungspuffer gelöst. Der Rehydrierungspuffer bestand aus 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% CHAPS und Spuren von Bromphenolblau. Zusätzlich wurden noch 1% (v/v) der dem pH-Bereich des Gels entsprechenden Trägerampholyte und 1,2% (v/v) DeStreak®-Reagenz (verringert Oxidation und Schmieren) zugefügt. Die Probe wurde in eine spezielle Vorrichtung gegeben und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten in diese Lösung gelegt, so dass keine Luftblasen die Aufnahme stören. Um den Streifen vor Austrocknung zu schützen, wurde er mit Paraffinöl bedeckt und für mindestens 4 Stunden rehydriert (die Probe sollte vollständig aufgesogen sein). Die nachfolgende IEF wurde mit einem 3100 OFFGEL Fraktionator nach dem Firmenprotokoll durchgeführt und so lange mit maximal 500 V laufen gelassen bis 8 kVh erreicht wurden. Zur Vorbereitung auf die zweite Dimension wurden die IPG-Streifen nach der IEF mit Äquilibrationpuffer (75 mM Tris/HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, Spuren von Bromphenolblau) behandelt. Für die Reduktion und Alkylierung der im Streifen befindlichen Proteine wurde dem Äquilibrationpuffer je 1 mg/ml DTT bzw. 1,6 mg/ml IAA zugefügt. Bei beiden Schritten wurde der Streifen vollständig mit dem Puffer bedeckt und für 30 min bei RT inkubiert. Die Alkylierung fand im Dunklen statt.

Die Herstellung der Trenngele erfolgte wie in 3.3 beschrieben, es wurden jedoch Abstandshalter mit einer Tiefe von einem 1 mm verwendet. Die Trägerseite des äquilibrierten IPG-Streifens lag auf der unteren größeren Glasplatte auf und wurde so auf dem Trenngel platziert, dass keine Luftblasen den Übergang zwischen erster und zweiter Dimension stören. 7 µl Proteingrößenmarker wurden auf ein Filterpapier getropft, das am anodischen Ende des Streifens aufgelegt wurde. Danach wurden Streifen und Filterpapier mit 4% Sammelgel einpolymerisiert, um ein Verrutschen zu verhindern. Als fester Parameter für die SDS-PAGE diente der Stromfluss. Die Gele wurden 15 min mit 10 mA pro Gel einlaufen gelassen, danach wurde der Wert auf 15 mA erhöht und für 2 h elektrophoretisch getrennt.

3.5 Färbemethoden

3.5.1 Silberfärbung

In dieser Arbeit wurde das Protokoll nach Shevchenko [Shevchenko 1996] verwendet. Da diese Methode nur selten angewendet wurde, soll nicht näher darauf eingegangen werden.

3.5.2 Kolloidale CBB-Färbung

Die kolloidale CBB-Färbung nach Neuhoff [Neuhoff 1988] wurde als Standardfärbung verwendet. Für die Fixierung der Proteine wurden die Gele mindestens für 1 h in 50% Methanol/10% Essigsäure unter leichtem Schütteln inkubiert. Für die eigentliche Färbung wurden zwei Stammlösungen benötigt:

Für Stammlösung I wurden 3-4 g *Coomassie Brilliant Blue G 250* in 250 ml 7,5% Essigsäure gelöst, die Lösung auf 60-70 °C erwärmt und langsam 75 g Ammoniumsulfat hinzugegeben. Nach dem Abkühlen wurde der präzipitierte Farbstoff abfiltriert, in 100 ml warmem Methanol gelöst und abschließend 200 ml Aceton zugefügt. Stammlösung II enthielt 100 g Ammoniumsulfat, das in 500 ml Wasser gelöst wurde. Unter kräftigem Rühren wurde 20 g Phosphorsäure zugegeben und mit Wasser auf 800 ml aufgefüllt.

20 ml Stammlösung I, 200 ml Stammlösung II und 30 ml Methanol wurden gemischt und die Gele über Nacht in dieser Lösung gelassen. Die Mikrowellenfärbung wird nach einem adaptierten Protokoll durchgeführt [Nesatyy 2002]. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurden die Gele maximal 1 min in 25% Methanol entfärbt und abschließend in 20% Ammoniumsulfat-Lösung gelagert.

3.5.3 EZ-Färbung

Die EZ-Färbetechnik beruht auf der Bildung von Komplexen aus dem positiv geladenen Ethylviolett und dem negativ geladenen Farbstoff Zincon. Folgendes Protokoll nach Choi [Choi 2004] wurde für die Färbung angewendet: Nach mindestens 30-minütigem Fixieren in 40% Ethanol/10% Essigsäure wurden die Gele für 1 h in einer Lösung geschüttelt, die 0,004% Zincon und 0,003% Ethylviolett in 24% Ethanol/7% Essigsäure enthielt. Danach wurde 30 s mit 40% Ethanol/10% Essigsäure und anschließend 5 min mit Wasser gewaschen.

3.5.4 RuBPS-Färbung

Bei der RuBPS (Ruthenium-Bathophenanthrolindisulfonat)-Färbung kommt es zwischen dem fluoreszierenden Rutheniumchelat und den Proteinen im Gel zu elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen. Der RuBPS-Farbstoff, hergestellt nach[Hampel 2005], wurde von Prof. Jörg Soppa zur Verfügung gestellt und die Gele nach dem Protokoll von Rabilloud [Rabilloud 2001] gefärbt. Die Gele wurden 4 mal 30 min in 30% Ethanol/10% Essigsäure fixiert, danach ebenfalls 4 mal 30 min mit 20% Ethanol gewaschen. Über Nacht wurden die Gele in 200 nM RuBPS/20% Ethanol inkubiert und am nächsten Morgen zweimal mit Wasser für 10 min gespült.

3.5.5 Lumitein™-Färbung

Ein weiterer Fluoreszenz-Farbstoff ist das kommerziell erwerbliche Lumitein. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 2 h in Lumitein-Lösung inkubiert, anschließend 5 min in 30% Methanol/15% Essigsäure entfärbt und dann mindestens für 5 min mit Wasser gewaschen.

Alle Schritte wie Fixieren, Färben etc. wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Die Gele wurden mit einem kommerziell erwerblichen Scanner aufgenommen. Die Fluoreszenz-markierten Proteine wurden mit einem *Typhoon* Scanner gescannt, dessen Anregungswellenlänge 488 nm betrug. Die Emission des Farbstoffes wurde bei 610 nm gemessen.

3.6 Western Blot

Die Methode des Immunblottens wurde mit freundlicher Unterstützung von S. Baltruschat (AK Karas) nach dem Referenzwerk *Molecular Cloning* durchgeführt [Sambrook 2001].

3.7 Proteolytischer Verdau im Gel

Für den typischen *Bottom-Up*-Ansatz werden Proteine mittels einer Protease in Peptide gespalten und anschließend massenspektrometrisch vermessen. Vor dem enzymatischen Verdau wurden die angefärbten Proteinbanden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Falls die aufgetragene Proteinmenge unter dem Detektionslimit der Färbemethode lag, wurde auf gleicher Höhe mit den angefärbten Banden ausgeschnitten. Danach wurden die Gelstreifen in kleine Würfel (1 mm^3) zerkleinert und diese in eine Mikrotiterplatte überführt. Im Folgenden ist der Standardverlauf eines proteolytischen in-Gel Verdau aufgeführt [adaptiert nach Shevchenko 2006].

Tab. 3.11 Protokoll für den proteolytischen Verdau im Gel

Schritt	Durchführung	Vol. [μl]	Temp. [°C]	Zeit [min]
1	Entfärben 2 x			
	cCBB, EZ: 50% ACN/ 25 mM Ambic	150	37	30
	RuBPS: 50% MeOH/ 25 mM Ambic	150	37	60
2	Dehydrieren 2 x			
	100% ACN	100	RT	10
3	Reduzieren			
	10 mM DTT in 25 mM Ambic	100	56	60
4	Alkylieren			
	55 mM IAA in 25 mM Ambic	100	RT	45
5	Waschen 2 x			
	25 mM Ambic	150	RT	5
6	Esterhydrolyse			
	Ammoniak (5 M)	100	RT	120
7	Waschen 3 x			
	25mM Ambic	150	RT	5
8	Dehydrieren 2 x			
	100% ACN	100	RT	10
9	Zugabe & Inkubation der Protease			
	Trypsin (6,25ng/ μl) in 10% ACN/ 25 mM Ambic	20	auf Eis	45
oder	Elastase (2,5ng/μl) in Wasser	20	auf Eis	45
oder	Pepsin (2,5ng/ μl) in 0,1% TFA	20	auf Eis	45
10	Zugabe Verdaulösung			
	Trypsin/ Elastase: 10% ACN/ 25mM Ambic	50	RT	-
oder	Pepsin: 0,1% TFA	50	RT	-
11	Verdau			
	Trypsin	-	37	über Nacht
oder	Elastase/ Pepsin	-	RT	über Nacht
12	Überführen des Überstands in neue Platte			
13	Extraktionsschritt 1			
	70% ACN/ 5% FA	50	RT	30
	danach in neue Platte überführen			
14	Extraktionsschritt 2			
	95% ACN/ 5% FA	50	RT	30
	danach in neue Platte überführen			
15	Trocknen der gesammelten Überstände in der Vakuumzentrifuge			

Die Schritte 2, 3, 4, und 5 entfielen, wenn die zu analysierenden Proteine keine Cysteine enthielten. Schritt 6 – die Esterhydrolyse – wurde nur durchgeführt, wenn das Gel aus gemischten *Crosslinkern* zusammengesetzt war.

3.8 Massenspektrometrische Untersuchungen mittels MALDI

3.8.1 Probenvorbereitung

Einige Proben wurden mittels ZipTips, die C18 Material enthielten, aufgereinigt. Dies erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

3.8.2 Präparation

Nach einem proteolytischen Verdau wurden die eingetrockneten Gel-Extrakte in 5 µl 70% ACN/0,1% TFA aufgenommen. Als Matrix fungierte CHCA in einer Konzentration von 3 mg/ml, gelöst in 50% ACN/0,1% TFA. Die Präparation erfolgte nach der *Dried Droplet*-Methode. 0,5 µl der Probe wurden mit 0,5 µl der Matrixlösung auf einen MALDI-Probenteller punktförmig aufgetragen und an der Luft trocknen und kristallisieren gelassen. Die *Spots* wurden anschließend mit kalter 5% Ameisensäure gewaschen, um Salzverunreinigungen zu entfernen. Falls nötig, wurden die Spots noch einmal mit 0,7 µl der oben beschriebenen Aufnahmelösung rekristallisiert.

3.8.3 MALDI Massenspektrometrie

Für die Vermessung von Peptiden wurde ein 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer verwendet. Eine externe 13 Punkt-Kalibrierung des Plattenmodells wurde mit Hilfe von 4 Peptiden aus dem *Sequazyme Peptide Mass Standards Kit* durchgeführt. Die MS-Spektren wurden im positiven Reflektor-Modus aufgenommen. 1500 bis 2000 Laserschüsse wurden aufsummiert. Für die Generierung von MS/MS-Spektren wurde Luft als Kollisionsgas und eine Energie von 1kV verwendet. Je nach Qualität der Spektren wurden 1500 bis 2500 Laserschüsse pro *Precursor* aufgenommen.

3.8.4 Datenauswertung

Die MS-Spektren wurden in allen Fällen deisotopiert und mit Hilfe der DataExplorer®4.9-Software analysiert oder mit der im 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer zugänglichen *Peaks2Mascot*-Software in MGF (*mascot generic file*)-Dateien umgewandelt. Für die Auswertung tryptischer Proteolysen wurde der minimale S/N-Wert auf 15 gesetzt und in der Regel alle Signale über 850 m/z ausgewertet. Bei gehobener Spektrenqualität konnte zusätzlich der Bereich zwischen 700 und 850 m/z miteinbezogen werden. In den meisten Fällen war jedoch hier die Basislinie der Spektren bereits zu intensiv, so dass keine vernünftige Signalerkennung möglich war. Die Datenbanksuche wurde mit der MASCOT™-Suchmaschine v2.2.03 (Matrix Science Ltd.) [Perkins 1999] mit folgenden Parametern durchgeführt: 30 oder 50 ppm Suchgenauigkeit bei tryptischer Spezifität. Im Fall einer Reduktion und Alkylierung wurde eine Carbamidomethylierung als feststehende Modifikation mit einbezogen. Eine Methioninoxidation wurde immer als optionale Modifikation gewählt und zwei überlesene Schnittstellen toleriert.

Die Daten der Standardproteine wurden gegen eine kleine 32 Sequenzen enthaltende interne Datenbank gesucht, die aus SwissProt/TrEMBL generiert wurde.

Im Fall des Elastaseverdaus von Bacteriorhodopsin wurden die Pyroglutamat-Modifizierung des N-Terminus und eine mögliche Methioninoxidation festgelegt. Der minimale S/N-Wert betrug 10 und die Suchgenauigkeit 10 ppm, nachdem auf 4 interne Peptide nachkalibriert wurde. Es wurde die Verdauspezifität AVLIST gewählt und eine unbegrenzte Anzahl überlesener Schnittstellen berücksichtigt. Peptide unter 900 Da wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Pepsinverdaus wurden ohne Schnittspezifität gesucht. Eine mögliche Methioninoxidation wurde angegeben. Der minimale S/N-Wert betrug 15 und die Suchgenauigkeit 10 ppm, nachdem auf 4 interne Peptide nachkalibriert wurde. Der Abgleich von Massenlisten und theoretischen Peptidmassen erfolgte in beiden Fällen über BioTools™ 2.2 (Bruker Daltonics) und den zugehörigen Sequence Editor™ 2.2.

Für die Datenbanksuche von Fragmentspektren der Proben der cytosolischen *C. glutamicum*-Extrakte wurde 60 ppm *Precursor*-Toleranz und <0,3 Da MS/MS Fragment-Toleranz gewählt. Die Proben wurden gegen eine *C. glutamicum* ATCC 13032 Bielefeld Datenbank verglichen, die 3059 Einträge enthielt.

Die Messungen der Komplex I-Aufreinigung wurden mit 50 ppm *Precursor*-Toleranz und 0,5 Da MS/MS Fragment-Toleranz sowohl gegen eine in-Haus-Datenbank von *Aquifex aeolicus* (1668 Einträge) als auch gegen ein Datenbank gesucht, die nur die 24 Isoformen des Komplex I enthielt. Beide Datenbanken wurden aus der SwissProt/TrEMBL-Datenbank generiert. Nur signifikante Peptide, deren MS/MS-Score den MASCOT Identitäts- oder hoher Homologieschwellenwert (*identity or extensive homology threshold*) überschritten, wurden in die Ergebnisse mit einbezogen.

Für die Analyse der *C. glutamicum*- als auch der Komplex I-Probe gelten oben beschriebene Suchparameter für tryptische Proteolysen.

4. Ergebnisse

4.1 NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (*Aquifex aeolicus*)

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit Guohong Peng (Arbeitsgruppe Michel, MPI für Biophysik) durchgeführt. Als Teil der Atmungskette des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus* besteht die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus 13 Untereinheiten, die durch 24 unterschiedliche Gene codiert werden (Tab. 4.1). Da von einigen Untereinheiten unterschiedliche Isoformen existieren, ist es möglich, dass es Komplex I-Varianten in verschiedenen Zusammensetzungen gibt. Der Aufbau des Komplex I soll durch massenspektrometrische Identifizierung dieser Proteine charakterisiert werden.

Tab. 4.1 Untereinheiten und potentielle Isoformen des Komplex I

* bereits per Edman-Sequenzierung identifizierte Untereinheiten [Peng 2003], *Acc. No.* – Nummer des Datenbankeintrags, *Mr* – molare Masse, *pI* – isoelektrischer Punkt, *TMH* – vorhergesagte Transmembranhelices, *GRAVY* – Maß für Hydrophobizität

Untereinheit	<i>Acc.-No.</i>	<i>Mr</i> (kDa)	<i>pI</i>	<i>TMH</i>	<i>GRAVY</i>
Nuo A1	067392	14,83	4,27	3	0,703
Nuo A2	067333	13,33	4,33	3	0,721
Nuo B	067334	19,88	8,63	3	0,109
Nuo D1	066826	68,69	5,69	1	-0,299
Nuo D2*	067335	67,89	5,95	2	-0,387
Nuo E*	066842	18,55	5,43	0	-0,181
Nuo F*	066841	47,51	6,03	1	-0,318
Nuo G*	066748	72,78	5,83	2	-0,329
Nuo H1*	067336	36,92	7,75	8	0,961
Nuo H2	067384	28,79	6,43	5	0,838
Nuo H3	067385	11,6	10,93	3	1,069
Nuo I1*	067337	23,41	8,92	1	-0,398
Nuo I2	067386	24,57	9,19	1	-0,438
Nuo J1	067338	17,86	6,59	5	1,231
Nuo J2	067387	19,38	6,59	5	1,150
Nuo K1	067339	10,74	6,55	3	1,195
Nuo K2	067388	10,90	5,72	3	1,082
Nuo L1	067340	68,94	8,83	15	0,766
Nuo L2	067027	88,99	6,56	20	0,892
Nuo L3	067389	71,95	6,05	15	0,758
Nuo M1*	067341	55,03	6,35	14	0,935
Nuo M2	067390	56,53	8,62	13	0,986
Nuo N1	067342	51,29	8,62	11	0,939
Nuo N2	067391	54,27	9,16	12	0,929

4.1.1 Untersuchung der Untereinheiten nach der Standardaufreinigung

Nach der in 3.2.4 beschriebenen Aufreinigung des Komplexes werden 15 µg der Probe einer gelelektrophoretischen Trennung über ein Tris-Glycin-Gel (T=15%) unterzogen. Für die massenspektrometrische Analyse wird die vorliegende Gelbande (Abb. 4.1) in gleich große Streifen (~1 mm Durchmesser) geschnitten, um eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen und wie in 3.7 beschrieben tryptisch verdaut. Die anschließende Analyse erfolgt per MALDI MS und MS/MS.

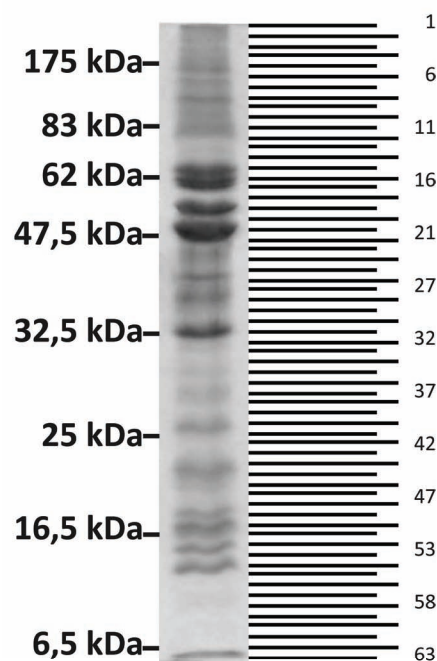


Abb. 4.1 Auftrennung des Komplex I von *A. aeolicus* per SDS-PAGE

Die Gelspur zeigt die Separierung der einzelnen Untereinheiten von Komplex I; rechts: Kennzeichnung der ausgeschnittenen Banden von 1-63 (ca. 1 mm Breite/Bande)

Die per MALDI MS identifizierten Proteine sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Es werden mehrere Verunreinigungen gefunden, u.a. einige Untereinheiten der ATP-Synthase, dem Komplex V der Atmungskette.

4. Ergebnisse

Tab. 4.2 Mittels PMF identifizierte Proteine in der Standardaufreinigung von Komplex I

Die linke Spalte zeigt die Ergebnisse für die Suche gegen eine komplette *A. aeolicus*-Datenbank ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 45). Die rechte Spalte zeigt die Ergebnisse für die Suche gegen eine Datenbank, die nur die Isoformen von Komplex I enthält ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 26). *Acc No.* – Nummer des Datenbankeintrags, *Mr* – molare Masse, *Pep.* – Anzahl der zugeordneten Peptide, *Score* – Wert des in der Datenbanksuche erhaltenen Mascot-Scores

Nr	Komplette <i>A. aeolicus</i> -Datenbank					Komplex I Datenbank			
	Protein	Acc. No.	Mr	Pep	Score	Protein	Mr	Pep	Score
1	-					-			
2	Cation efflux system	066770	113823	37	138	-			
	Uncharacterized protein aq_2168	067918	54292	20	103				
3	Uncharacterized protein aq_2168	067918	54292	10	61	-			
4	Putative uncharacterized protein	067026	118469	46	146	Nuo D2	67893	18	40
5	Putative uncharacterized protein	067026	118469	30	113	Nuo D2	67893	10	27
6	-					-			
7	DMSO reductase chain A	067280	113290	14	46	Nuo D2	67893	9	37
8	-					-			
9	Putative uncharacterized protein	067400	77955	18	91	-			
10	Putative uncharacterized protein	067173	103103	29	99	-			
	Putative uncharacterized protein	067026	118469	22	46				
11	Nuo D2	067335	67893	14	51	Nuo D2	67893	14	51
12	Nuo D2	067335	67893	14	85	Nuo D2	67893	14	85
13	Nuo D2	067335	67893	20	126	Nuo D2	67893	20	126
	Nuo G	066748	72777	16	80	Nuo G	72777	16	80
14	Nuo G	066748	72777	32	124	Nuo G	72777	32	124
	Nuo D2	067335	67893	27	99	Nuo D2	67893	27	99
15	-					Nuo D2	67893	6	29
16	-					-			
17	Nuo G	066748	72777	40	247	Nuo G	72777	40	247
						Nuo D1	68691	16	45
						Nuo D2	67893	12	32
18	Nuo G	066748	72777	44	233	Nuo G	72777	44	233
	Nuo D1	066826	68691	40	151	Nuo D1	68691	40	151
						Nuo D2	67893	15	31
19	Nuo D2	067335	67893	55	270	Nuo D2	67893	55	270
	Nuo G	066748	72777	39	154	Nuo G	72777	39	154
	Nuo D1	066826	68691	31	90	Nuo D1	68691	31	90
20	Nuo D2	067335	67893	50	211	Nuo D2	67893	50	21
	UPF0144 protein aq_1732	067622	64347	41	154	Nuo G	72777	25	56
	Nuo G	066748	72777	25	56				
21	ATP synthase subunit alpha	066907	55658	44	363	Nuo D2	67893	14	36
22	ATP synthase subunit alpha	066907	55658	40	263	Nuo D2	67893	17	41
	ATP synthase subunit beta	067828	53288	23	88				
23	ATP synthase subunit beta	067828	53288	61	292	Nuo F	47508	28	100
	Nuo F	066841	47934	28	100				
24	-					-			
25	ATP synthase subunit beta	067828	53288	32	114	Nuo F	47508	24	96
	Nuo F	066841	47508	24	94	Nuo D2	67893	20	41
	ATP synthase subunit alpha	066907	55658	24	88				
	Flavocytochrome C sulfide dehydrogenase	066598	49156	21	50				
26	ATP synthase subunit beta	067828	53288	23	81	Nuo F	47508	20	74
	ATP synthase subunit alpha	066907	55658	22	79				
	Nuo F	066841	47508	20	74				
	Flavocytochrome C sulfide dehydrogenase	066598	49156	23	66				
27	Putative uncharacterized protein	067714	42671	24	170	Nuo F	47508	11	48
	ATP synthase subunit beta	067828	53288	18	89				
	Acriflavin resistance protein AcrE	066917	42129	17	71				

4. Ergebnisse

Komplette <i>A. aeolicus</i> -Datenbank						Komplex I Datenbank			
Nr	Protein	Acc. No	Mr	Pep	Score	Protein	Mr	Pep	Score
	ATP synthase subunit alpha	066907	55658	13	55				
28	Putative uncharacterized protein	067714	42671	40	300	-			
	ATP synthase subunit beta	067828	53288	16	51				
29	ATP synthase subunit alpha	066907	55658	27	107	-			
	Putative uncharacterized protein	067714	42671	17	66				
30	-					-			
31	-					-			
32	ATP synthase gamma chain	067829	33531	15	79	-			
33	ATP synthase gamma chain	067829	33531	38	308	-			
34	ATP synthase gamma chain	067829	33531	42	368	-			
	UPF0169 lipoprotein aq_1273	067310	36494	14	50				
35	ATP synthase gamma chain	067829	33531	42	393	-			
36	ATP synthase gamma chain	067829	33531	35	225	-			
37	ATP synthase gamma chain	067829	33531	22	101	Nuo I2	24572	11	33
						Nuo H1	36923	9	30
38	-					-			
39	-					-			
40	Nuo I1	067337	23410	30	165	Nuo I1	23410	30	165
41	Nuo I1	067337	23410	33	224	Nuo I1	23410	33	224
42	Nuo I1	067337	23410	19	83	Nuo I1	23410	19	83
43	-					-			
44	Nuo B	067334	19880	16	100	Nuo B	19880	16	10
	Peptidoglycan associatedlipoprotein	067903	23013	15	51				
45	Nuo B	067334	19880	9	55	Nuo B	19880	9	55
46	-					-			
47	-					-			
48	ATP synthase F0 subunit b	067526	21228	12	52	-			
49	ATP synthase F0 subunit b	067526	21228	21	170	Nuo E	18551	10	70
	Nuo E	066842	18551	10	70	Nuo J1	17859	5	28
50	ATP synthase F0 subunit b	067526	21228	19	109	Nuo E	18551	15	74
	Nuo E	066842	18551	15	74	Nuo B	19880	13	60
	Nuo B	067334	19880	13	60	Nuo J1	17859	7	34
51	Nuo B	067334	19880	12	72	Nuo B	19880	12	72
	Nuo E	066842	18551	11	63	Nuo E	18551	11	63
	ATP synthase epsilon chain	066903	14797	8	57				
52	ATP synthase F0 subunit b	067525	16709	12	113	Nuo B	19880	4	29
53	ATP synthase F0 subunit b	067525	16709	26	218	-			
54	ATP synthase F0 subunit b	067525	16709	7	59	-			
55	-					-			
56	-					-			
57	-					-			
58	-					-			
59	-					Nuo K1	10738	4	28
60	-					Nuo K1	10738	4	27
61	-					-			
62	-					-			
63	-					-			

Zusätzlich zu den identifizierten Proteinen liefert die zweite Suche gegen die kleine Datenbank Hinweise auf Untereinheiten, die aufgrund ihrer geringen Peptidanzahl mittels PMF nicht signifikant nachgewiesen werden können. Durch eine gezielte Fragmentierung dieser Peptide ist es möglich, 20 von 24 Untereinheiten der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase zu detektieren (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 MS/MS-verifizierte Identifizierung der Untereinheiten von Komplex I

Tabelle der Untereinheiten des Komplex I und ihrer fragmentierten Peptide; Protein *Score* – gibt den Mascot Score für im PMF zugeordnete und fragmentierte Peptide zusammen an ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 45); x – nicht identifizierte Untereinheit; Peptide – Anzahl der im PMF zugeordneten Peptide, MS/MS – Sequenz des fragmentierten Peptids; *Ion Score* – Mascot *Score* des fragmentierten Peptids ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 15)

Unter-einheit	Protein Score	Peptide	Sequenz abdeckung (%)	MS/MS	Ion Score
Nuo A1	75	2	25	EPQIYEDYPYECGVPLYDK	67
Nuo A2	266	3	18	KRDPLEDYPYECGVPLYDPEAR	90
				RDPLEDYPYECGVPLYDPEAR	43
				DPLEDYPYECGVPLYDPEAR	116
Nuo B	286	16	72	EIEKEGIFVPR	43
				VAINSGFVTTTVEELLR	111
				LFADFNREIEKEGIFVPR	45
Nuo D1	420	38	61	GSGIPYDIR	24
				EDAYFHGVTGPVIR	75
				FQAFYILYNVDER	79
				GELGFYVVSTGGTSPYR	81
				YVADAVTILASIDPVVGETDR	34
Nuo D2	757	56	74	GFEVSHDFLKPLLK	28
				FQGVYILYNPEENER	92
				LAENLHYFQFIPYTDR	105
				VVVHGEDAPPGEVYFAGENPR	124
				DFPLQGIPEVELPSLTEVLHGR	152
Nuo E	391	15	61	LQEHINYFPK	57
				TEFEFPEELKTK	52
				FESEVQLNEILSR	108
				ALENILGIKPGEVTPDGK	106
Nuo F	221	25	57	FAVQNPGPR	35
				GEYPAGYYILR	40
				NIQPTSICGLGAVAGR	57
Nuo G	647	43	55	RFEPHLYR	41
				YLLQALMTR + Ox(M)	32
				NKDITVYYER	79
				GFFGYDSINHKR	91
				MCVVYWEDINR + Ox(M)	20
				TVLQVALENGIDIPYFCYHPR	126

4. Ergebnisse

Unter- einheit	Protein Score	Peptide	Sequenz abdeckung (%)	MS/MS	Ion Score
Nuo H1	124	4	11	YAFIGSLR	26
				FGILQPLADALK	77
Nuo H2	58	6	15	LLTKEDLFPR	43
Nuo H3	x				
Nuo I1	358	30	65	FMSYEK + Ox (M)	20
				RPITTEYPK	15
				NLLRRPITTEYPK	15
				GAHGHYVWDGTEPDSLK	74
				FRGAHGHYVWDGTEPDSLK	40
Nuo I2	116	10	47	VVDGTEPQPAFQEWVNR	23
				IFFIDFIK	26
				YNILVEYGK	26
Nuo J1	123	7	17	FAEPSGVVKDNVEAVGR	92
Nuo J2	x				
Nuo K1	149	4	15	GYEASHEISQLRD	66
				LKGYEASHEISQLRD	56
Nuo K2	x				
Nuo L1	174	7	13	EGFLVFHGR	61
				LYHNVVAGGYLTYSR	105
Nuo L2	157	4	5	FLYPNQEIER	40
				FANLSFITQR	50
				FLTFNTFVYTHLSR	62
Nuo L3	69	7	12	EGFLVFHGR	61
Nuo M1	127	12	13	VMLEEEESIPEER	72
				VMLEEEESIPEER+ Ox (M)	50
				KVMLEEEESIPEER	42
				KVMLEEEESIPEER + Ox (M)	19
Nuo M2	87	5	11	FLTILAAAR	28
				LHTFNFASLR	53
Nuo N1	x				
Nuo N2	46	2	4	LAFFIPLVR	46

Folgende MS/MS-Spektren zeigen, dass selbst kleine und/oder sehr hydrophobe Untereinheiten wie Nuo A2 oder M1 durch gezielte Fragmentierung einzelner Peptide nachgewiesen werden können.

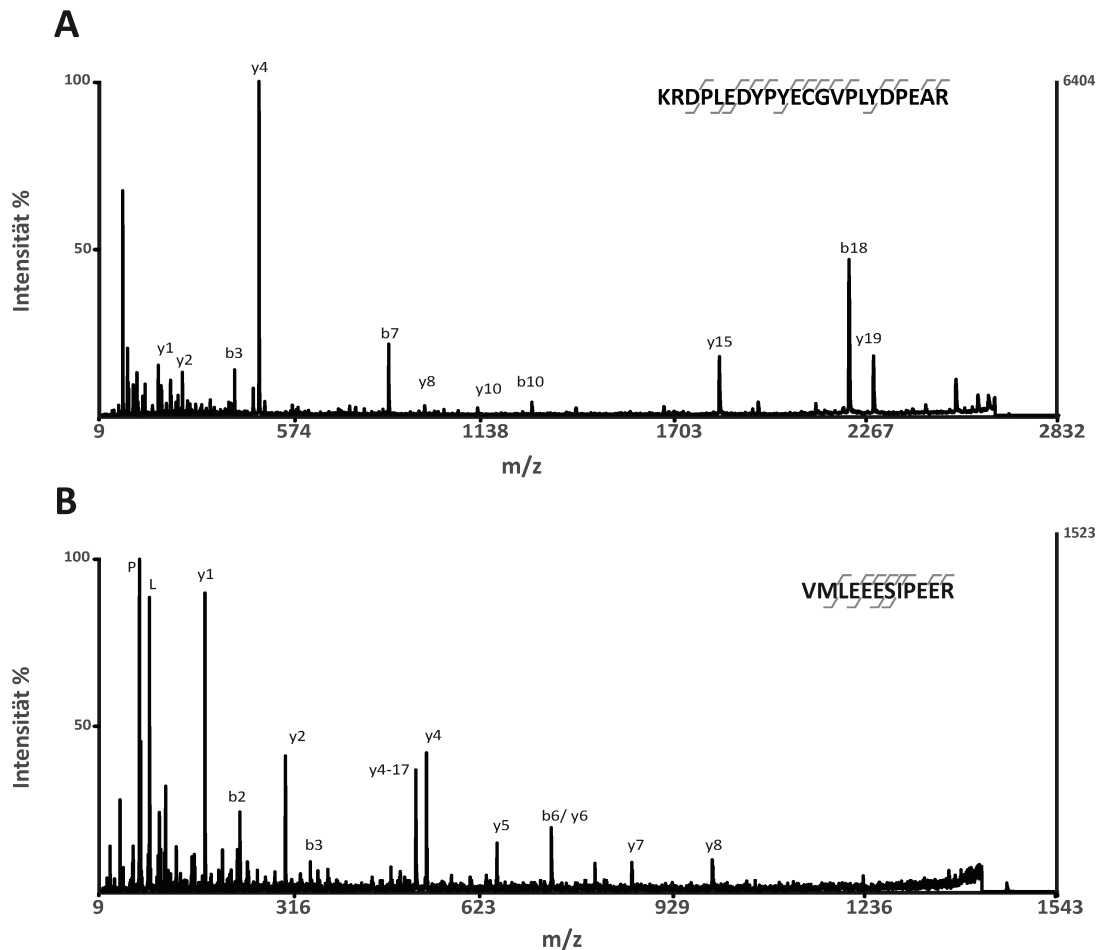


Abb. 4.2 Fragmentspektren von Peptiden hydrophober Untereinheiten

MS/MS (A) des Peptids 2682,28 Da der Untereinheit Nuo A2 und (B) des Peptids 1460,67 Da der Untereinheit Nuo M1; graue Markierungen in der Sequenz geben nachgewiesene b- und y-Ionen an; der *Ion Score* ist der Tabelle 4.3 zu entnehmen

Das Peptid 2682,25 Da zeigt trotz seiner hohen Masse eine gute Fragmentierung und weist eine ausgeprägte y-Serie auf. Es kann eindeutig der kleinen hydrophoben Untereinheit Nuo A2 zugeordnet werden. Das Peptid mit der Masse 1460,67 Da der Untereinheit Nuo M1 zerfällt sowohl in b- als auch in zahlreiche y-Ionen wie in Abb. 4.2 zu sehen ist.

Auch der Nachweis verschiedener Isoformen einer Untereinheit ist möglich. In dieser Probe werden z.B. sowohl die Isoform Nuo D1 als auch die Isoform Nuo D2 mittels PMF identifiziert und per MS/MS verifiziert (Abb. 4.3).

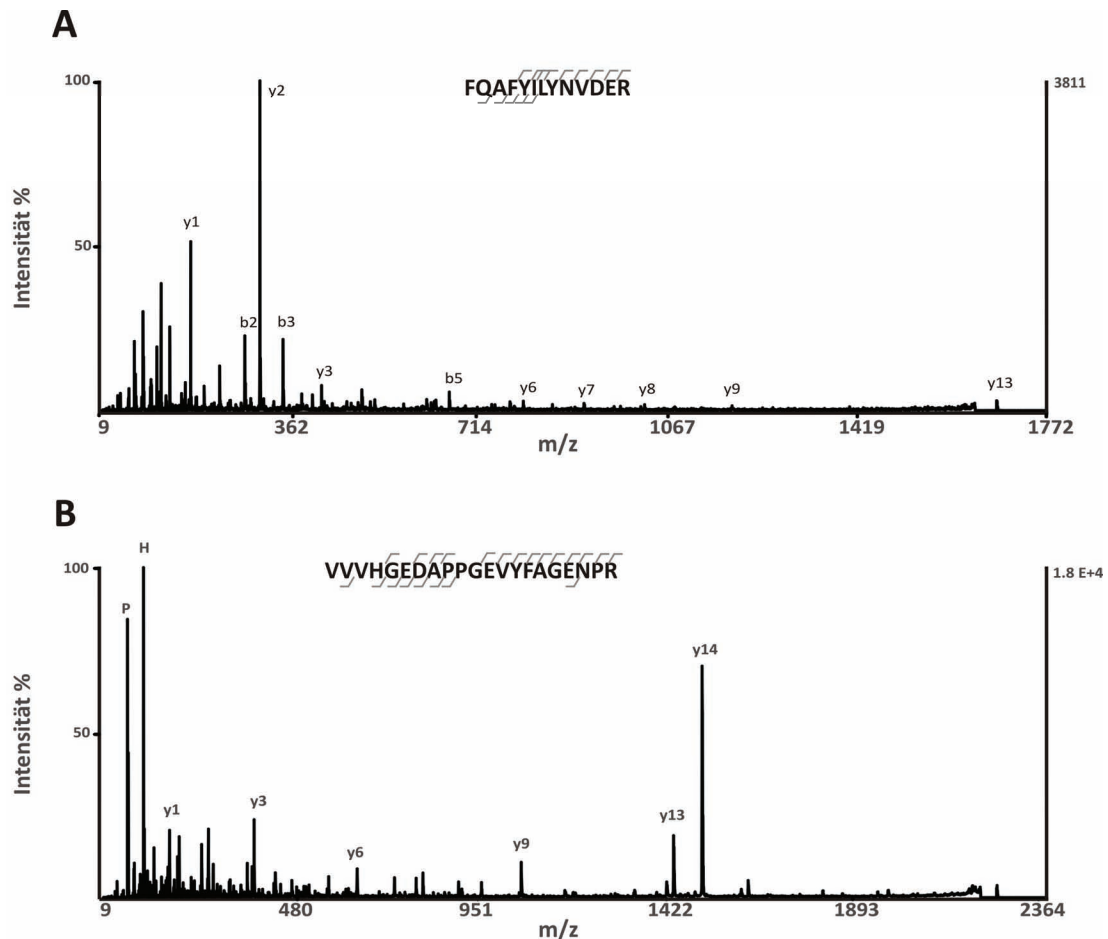


Abb. 4.3 Fragmentspektren von Peptiden der Isoformen Nuo D1 und D2

Durch Fragmentierung bekräftigtes Vorliegen unterschiedlicher Isoformen einer Untereinheit von Peptiden. MS/MS-Spektren zeigen (A) Peptid 1677,86 Da der Untereinheit Nuo D1 und (B) Peptid 2339,10 Da der Untereinheit Nuo D2; graue Markierungen in der Sequenz geben nachgewiesene b- und y-Ionen an; der *Ion Score* ist der Tabelle 4.3 zu entnehmen

Beide Isoformen Nuo D1 und D2 liegen hoch abundant in der Aufreinigung vor und können in mehreren Gelbanden identifiziert werden.

4.1.2 Untersuchung der Untereinheiten nach modifizierter Aufreinigung

Bei der Analyse einer weiteren Probe steht der Vergleich von zwei verschiedenen Komplex I-Proben im Vordergrund. Neben der Standardaufreinigung der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase wird ein modifiziertes Protokoll durchgeführt, welches das Ziel hat, die hydrophoben Untereinheiten abzutrennen und ausschließlich die hydrophilen Teile des Komplexes zu erhalten. Je 7 µg der zwei Proben werden mit einem NuPAGE®-Gradientengel 12-4% (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

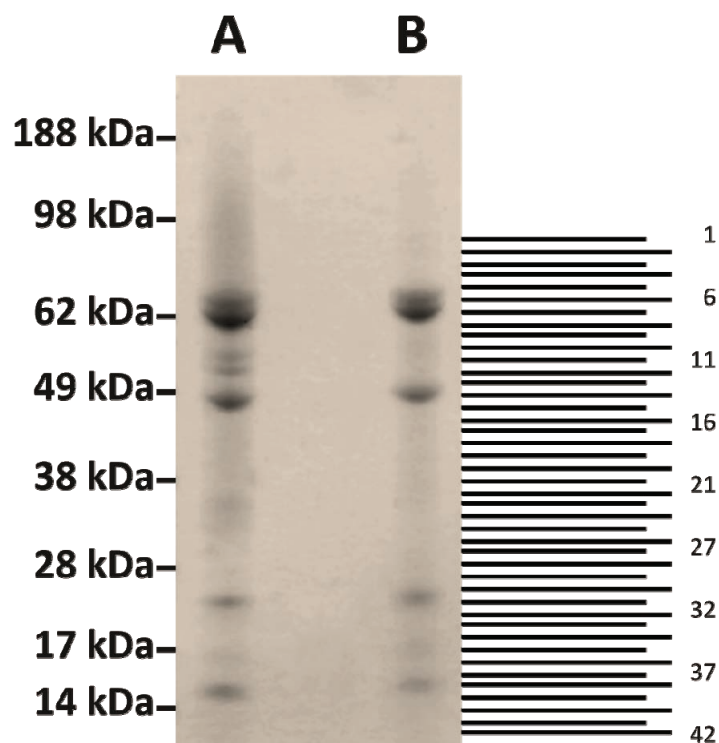


Abb. 4.4 Auftrennung der Untereinheiten des Komplex I nach modifizierter Reinigung

Die Gelspuren zeigen die Separierung der einzelnen Untereinheiten von Komplex I; (A) zeigt den Komplex I nach der Standardaufreinigung, (B) nach einer modifizierten Aufreinigung, die das Ziel hat, die hydrophoben Untereinheiten zu entfernen; Zahlen auf der rechten Seite: Kennzeichnung der ausgeschnittenen Banden von 5-42 (ca. 1 mm Breite/Bande)

Die Komplex I-Proben werden massenspektrometrisch auf unterschiedliche Untereinheiten untersucht. Auch bei diesem Experiment werden die Banden in gleich große Streifen geschnitten. Bei der Probe, die ausschließlich hydrophile Untereinheiten enthalten soll, werden die Streifen 1-4 zusätzlich untersucht, da auf dieser Höhe sehr schwache Proteinbanden zu erkennen sind. Nach dem tryptischen in-Gel Verdau (siehe Kapitel 3.7) erfolgt die Vermessung mittels MALDI-MS und MS/MS.

Tab. 4.4 Proteinidentifikation nach Standard- und modifizierter Aufreinigung der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase

Tabelle der mittels PMF-Suche gegen eine *A. aeolicus*-Datenbank ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 45) gefundenen Proteine der unterschiedlichen Komplex I-Aufreinigungen. Die linke Spalte zeigt die Ergebnisse der Standardaufreinigung Die rechte Spalte zeigt die Ergebnisse die nach der modifizierten Aufreinigung zur Abtrennung der hydrophoben Untereinheiten erhalten worden sind. Protein (*Acc. No.*) – identifiziertes Protein (Nummer des Datenbankeintrags), Peptide – Anzahl der mittels PMF zugeordneten Peptide, *Score* – durch die Datenbanksuche erhaltener Mascot-Score

Standardaufreinigung				Modifizierte Aufreinigung		
Nr	Proteine (<i>Acc. No.</i>)	Peptide	Score	Proteine	Peptide	Score
1	nicht analysiert			Nuo G/ Nuo D2/ Nuo F	46/ 32/ 13	230/ 138/ 46
2	nicht analysiert			Nuo G/ Nuo F/ Nuo D2	44/ 25/ 29	213/ 141/ 107
3	nicht analysiert			Nuo D2/ Nuo G/ Nuo F	35/ 40/ 21	179/ 152/ 87
4	nicht analysiert			Nuo D2/ Nuo G	38/ 43	199/ 194
5	Nuo G	56	355	Nuo G	56	413
6	Nuo D2/ Nuo G	49/ 30	259/ 115	Nuo D2/ Nuo G	54/ 35	297/ 140
7	Nuo D2/ Nuo G	39/ 36	145/ 97	Nuo D2/ Nuo G	48/ 47	269/ 241
	UPF0144 protein aq_1732 (O67622)	29	78			
	ATP synthase subunit alpha (O66907)	21	61			
	Putative uncharacterized protein (O67026)	36	52			
8	ATP synthase subunit alpha (O66907)	43	305	Nuo G/ Nuo D2/ Nuo F	44/ 39/ 13	232/ 196/ 52
9	ATP synthase subunit beta (O67828)	55	331	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	41/ 28/ 38	202/ 163/ 161
10	Nuo F/ Nuo G	29/ 31	143/ 93	Nuo F/ Nuo G/ Nuo D2	36/ 29/ 25	240/ 103/ 82
	ATP synthase subunit beta (O67828)	36	132			
	ATP synthase subunit alpha (O66907)	24	89			
11	Nuo F	43	340	Nuo F	44	376
12	Nuo F/ Nuo D2	33/ 20	195/ 56	Nuo G/ Nuo F/ Nuo D2	38/ 31/ 34	183/ 182/ 151
13	Nuo F/ Nuo D2/ Nuo G	28/ 27/ 25	130/ 77/ 67	Nuo F/ Nuo D2/ Nuo G	23/ 31/ 24	122/ 116/ 86
14	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	37/ 18/ 28	123/ 57/ 53	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	38/ 25/ 33	183/ 145/ 127
	Putative uncharacterized protein (O67714)	20	69			
15	-			Nuo G/ Nuo F/ Nuo D2	37/ 27/ 33	166/ 164/ 148

4. Ergebnisse

Standardaufreinigung				Modifizierte Aufreinigung		
Nr	Proteine (Acc. No.)	Peptide	Score	Proteine	Peptide	Score
16	Nuo D2/ Nuo F	31/ 19	72/ 48	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	41/ 26/ 32	236/ 157/ 152
	UPF0144 protein aq_1732 (O67622)	25	53			
17	Nuo D2	23	50	Nuo D2/ Nuo G/ Nuo F	33/ 35/ 24	153/ 151/ 150
	UPF0144 protein aq_1732 (O67622)	34	107			
18	ATP synthase gamma chain (O67829)	29	155	Nuo D2/ Nuo G/ Nuo F	40/ 38/ 26	188/ 151/ 138
19	ATP synthase gamma chain (O67829)	36	303	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	36/ 25/ 34	176/ 145/ 141
20	ATP synthase gamma chain (O67829)	24	95	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	38/ 27/ 36	166/ 159/ 129
21	Dihydropicolinate reductase (O67061)	19	66	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	33/ 26/ 31	151/ 147/ 139
22	Nuo D2	27	89	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G	38/ 27/ 26	161/ 157/ 66
23	Putative uncharacterized protein (O66579)	20	68	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo G/ Nuo I1	42/ 24/ 25/ 14	221/ 125/ 56/ 45
24	Nuo I1/ Nuo D2	22/ 22	80/ 53	Nuo D2/ Nuo F/ Nuo I1/ Nuo G	42/ 21/ 21/ 25	219/ 102/ 99/ 59
25	Nuo I1	29	143	Nuo I1/ Nuo F	29/ 17	123/ 64
26	Nuo I1	24	115	Nuo I1/ Nuo F/ Nuo G/ Nuo D2	23/ 21/ 33/ 26	108/ 96/ 94/ 76
27	Nuo B/ Nuo I1	9/ 13	60/ 56	Nuo F/ Nuo G/ Nuo D2/ Nuo I1/ Nuo B	25/ 29/ 27/ 18/ 11	133/ 101/ 92/ 75/ 67
28	Nuo B	16	166	Nuo B/ Nuo F	18/ 23	134/ 73
29	Nuo B/ Nuo E	20/ 11	136/ 63	Nuo B/ Nuo F/ Nuo D2	15/ 17/ 19	97/ 79/ 62
30	Nuo B/ Nuo E	14/ 17	80/ 76	Nuo B/ Nuo E	15/ 16	88/ 79
31	Nuo E/ Nuo B	15/ 12	102/ 59	Nuo B/ Nuo G/ Nuo E/ Nuo F	15/ 25/ 12/ 15	78/ 63/ 59/ 52
	ATP synthase epsilon chain (O66903)	8	55			
32	ATP synthase F0 subunit b (O67525)	20	130	Nuo G/ Nuo D2/ Nuo F/ Nuo B		
	ATP synthase epsilon chain (O66903)	7	48			
33	Nuo G	19	55	Nuo F/ Nuo B/ Nuo G/ Nuo D2	17/ 11/ 20/ 20	90/ 58/ 51/ 50
34	-			Nuo F	12	49
35	Nuo A2	5	50	Nuo F	14	57
36	-			Nuo B/ Nuo D2/ Nuo F	14/ 23/ 14	90/ 82/ 55
37	-			Nuo F	12	58
38	-			Nuo D2	20	53
39	-			Nuo F	12	55

Die PMF-Ergebnisse zeigen, dass die normale Standardaufreinigung der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase noch einige Verunreinigungen enthält (11 Proteine). Wie auch schon bei der ersten Analyse (Kap. 4.1.1) handelt es sich vor allem um Proteine des Komplex V. Die Probe der modifizierten Aufreinigung weist dagegen kein Protein auf, das nicht zum Komplex I gehört. Es werden die hydrophilen Untereinheiten Nuo B, D2, E, F, G und I1 identifiziert. Vor allem Nuo D2, F und G sind hoch abundant, so dass sie durch das Gel schmieren und in fast allen Gelbanden zu finden sind. Per MS/MS-Untersuchung

soll nun bestätigt werden, dass in der Probe keine hydrophoben Untereinheiten vorhanden sind. Es wird verfahren wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben: die Spektren werden gegen die Datenbank gesucht, die nur Untereinheiten der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase enthält. Es werden keine signifikanten Hinweise auf hydrophobe Untereinheiten erhalten und auch die angeschlossenen MS/MS-Experimente liefern keinen Hinweis auf deren Vorhandensein. Es kann jedoch gezeigt werden, dass in der Standardprobe hydrophobe Untereinheiten wie beispielsweise Nuo J1 oder L1 zu finden sind und auch per MS/MS signifikant nachgewiesen werden können (Abb. 4.5). Nuo A2 oder M1 können sogar mit Hilfe mehrerer fragmentierter Peptide (Tab. 4.5) eindeutig identifiziert werden. Im Verhältnis ist die Zahl der hydrophoben Untereinheiten jedoch kleiner als bei der Analyse der ersten Standardprobe (siehe Tab. 4.3).

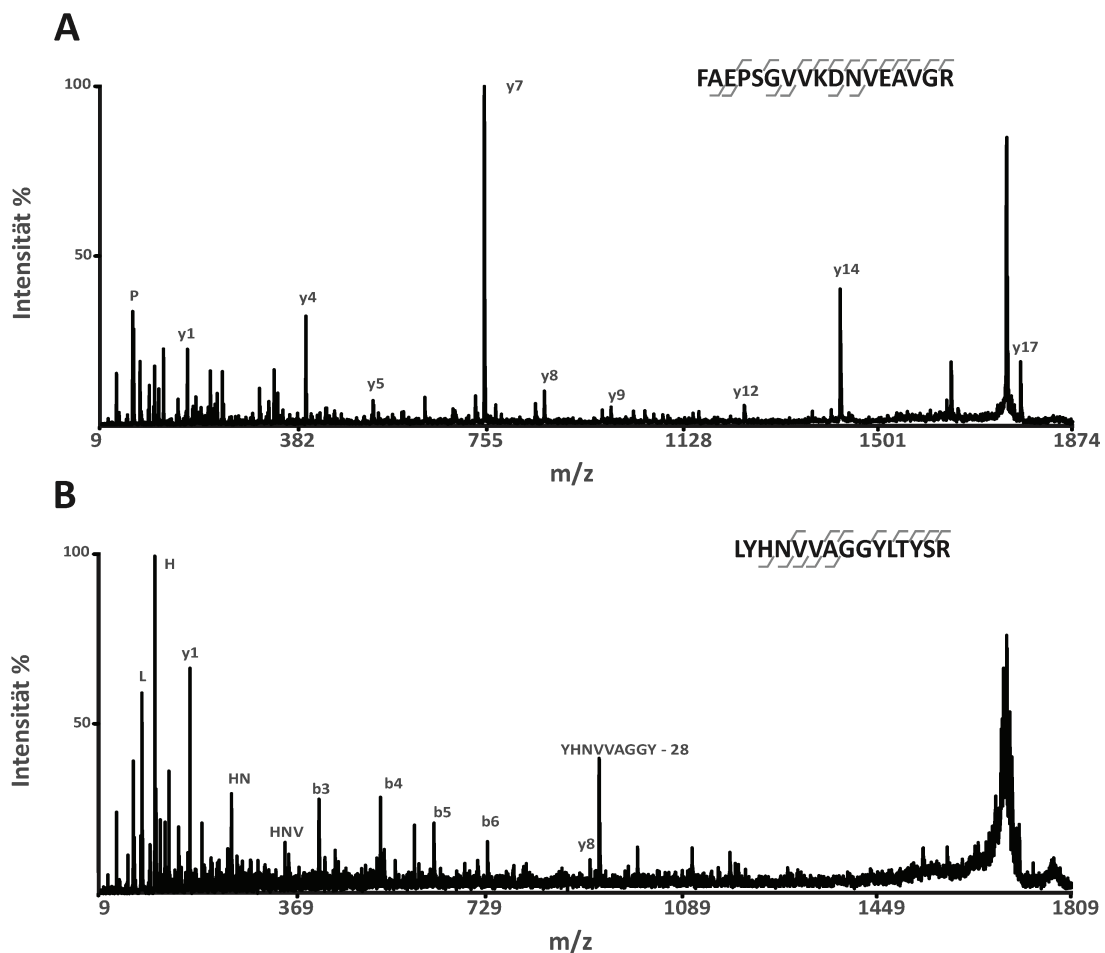


Abb. 4.5 Fragmentspektren hydrophober Untereinheiten in der Standardaufreinigung

Durch Fragmentierung verifizierte Beispielpolypeptide (A) von Untereinheit Nuo J1 (1773,95 Da) und (B) von Untereinheit Nuo L1 (1712,92 Da); graue Markierungen in der Sequenz geben nachgewiesene b- und y-Ionen an; der *Ion Score* ist der Tabelle 4.5 zu entnehmen

Tab. 4.5 MS/MS-Daten hydrophober Untereinheiten nach der Standardaufreinigung

Liste der mittels Fragmentierung einzelner Peptide identifizierten hydrophoben Untereinheiten nach der Standardaufreinigung. *Ion Score* – durch die Datenbanksuche erhaltener Mascot-Score des fragmentierten Peptids; *Threshold* - Signifikanzschwellenwert ($p < 0,05$)

Untereinheit	fragmentiertes Peptid	<i>Ion Score</i>	<i>Threshold</i>
Nuo A2	DPLEDYPYECGVPLYDPEAR	95	13
	RDPLEDYPYECGVPLYDPEAR	50	13
	KRDPLEDYPYECGVPLYDPEAR	47	14
Nuo M1	GFQFETYVPWIK	19	17
	KGFQFETYVPWIK	42	17
	VMLEEEESIPEERVEK	30	16
	VMLEEEESIPEER	50	15
	KVMLEEEESIPEER	21	17
	KGFQFETYVPWIK	23	17
Nuo L1	LYHNVVAGGYLTYSR	37	16
	FIHTTFKEQFFTEK	35	17
Nuo K1	LKGYEASHEISQLRD	36	18
Nuo H1	FGILQPLADALK	22	16
	YAFIGSLR	17	16
Nuo J1	FAEPSGVVKDNVEAVGR	89	17

Auffällig ist, dass im Gegensatz zur analysierten Standardprobe aus Kapitel 4.1.1 einige Isoformen nicht zu identifizieren sind. Weder die zweite Standardaufreinigung noch die Aufreinigung der hydrophilen Untereinheiten liefern beispielsweise einen Hinweis auf die Isoform Nuo D1. In der im ersten Abschnitt dieses Kapitels beschriebenen analysierten Probe kann Nuo D1 schon durch PMF-Suchen signifikant nachgewiesen werden. In der zweiten Probe ist diese Isoform also nicht vorhanden. Die Isoform Nuo I2 ist ebenfalls in keiner der beiden neuen Proben zu identifizieren.

4.2 Entwicklung eines Gelsystems mit erweiterbarer Porengröße

4.2.1 Herstellung, Aussehen, physikalische und Laufeigenschaften

Die Quervernetzer MBA und EDA ähneln sich in ihrer chemischen Struktur. Beide Moleküle können Acrylamidketten durch die Reaktion ihrer Vinylgruppen verknüpfen. Doch während in MBA eine Amidbindung vorliegt, besitzt EDA Esterbindungen und eine zusätzliche Methylengruppe, die die Crosslinkerlänge vergrößert (vergleiche Abb. 2.1). Es werden Gele mit unterschiedlichen MBA/EDA-Verhältnissen hergestellt. Hierbei wird der MBA-Anteil durch ein entsprechendes Äquivalent EDA ersetzt, die T%- und C%-Werte werden konstant gehalten. Beim optischen Vergleich von Standardgelen, die lediglich MBA als Quervernetzer enthalten, mit Mischgelen mit MBA/EDA-Anteil, kann auf den ersten Blick kein Unterschied festgestellt werden. In beiden Fällen erhält man durchsichtige Gele. Die Polymerisationsdauer für Mischgele ist jedoch leicht erhöht. Ebenso unterscheiden sich die beiden Systeme in ihren physikochemischen Eigenschaften. Gele, die EDA enthalten, wirken elastischer und gummiartiger je größer der EDA-Anteil ist. Sie zeichnen sich vor allem durch ein ausgeprägtes Aufquellen in wässriger Lösung aus (Abb. 4.6). Dieses Schwellverhalten ist von der EDA-Menge abhängig, so dass sich die Geldimensionen in Wasser sehr stark vergrößern. Der Zuwachs der Kantenlänge kann bis zu 20% betragen.

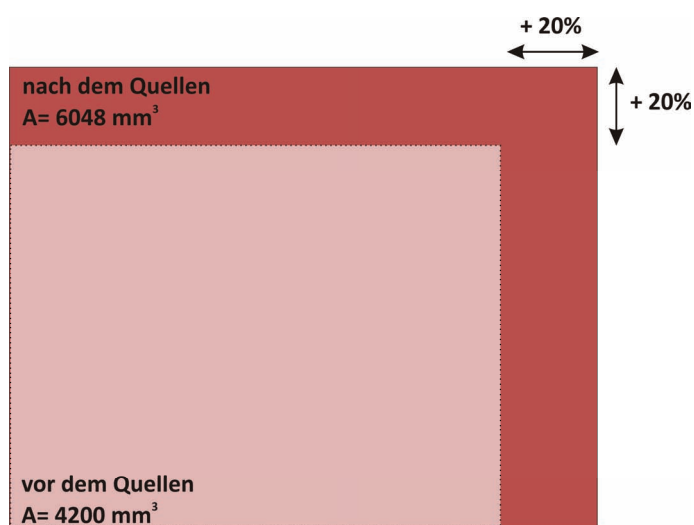


Abb. 4.6 Quellverhalten eines Gels mit EDA als Quervernetzer

Das Gel hat die durch das Gießen vorgegebene Größe der Gelplatte. Wird es in eine wässrige Lösung gelegt, quillt es auf

Die oben beschriebenen Eigenschaften treffen sowohl auf Tris-Glycin als auch auf Tris-Tricin Gele zu. Ob sich die gemischten Gele in ihren Trenneigenschaften von einem normalen MBA-Gel unterscheiden, wird per Elektrophorese überprüft. Mit den in Abschnitt 3.3 beschriebenen Parametern wird in Tris-Glycin Gelen eine Mischung aus je 1 pmol BSA und CAH aufgetrennt. Abbildung 4.7 zeigt die Änderung des Laufverhaltens bei unterschiedlichen MBA/EDA-Verhältnissen. Unter gleichen elektrophoretischen Parametern laufen Proteine in den Gelen mit zunehmender EDA-Menge schneller. Wenn die Migration von BSA als relativer Bezugspunkt angenommen wird, wandert CAH mit zunehmender EDA-Menge immer weiter im Gel. Das Trennvermögen nimmt in diesem Fall zu, die Auflösung der einzelnen Banden nimmt hingegen ab.

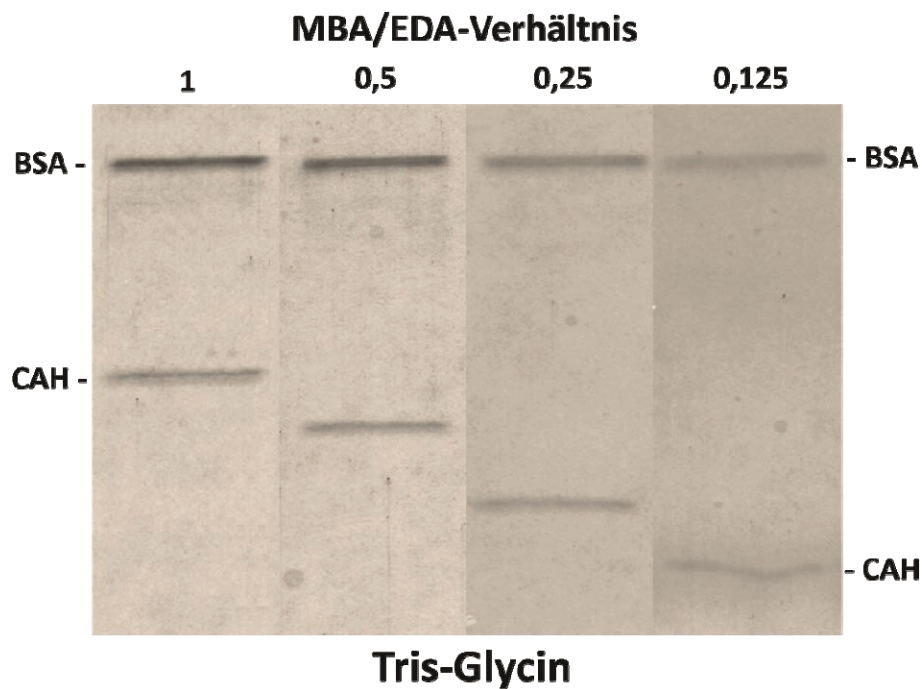


Abb. 4.7 Laufverhalten in Tris-Glycin Gelen mit unterschiedlichen MBA/EDA-Verhältnissen

Tris-Glycin Gel: T= 14%, C= 2,6%; die Laufweite ändert sich mit zunehmendem MBA/EDA-Verhältnis

Bei der Elektrophorese von Tris-Tricin Gelen wird ein ähnlicher Effekt beobachtet. Bei der Auftrennung eines d2Ant-Komplexes migrieren die beiden Untereinheiten Core I und II nahezu gleich. Dies ändert sich mit unterschiedlichen MBA/EDA-Verhältnissen. Je größer der EDA-Anteil im gemischten Gel, desto besser ist das Trennvermögen der beiden Proteine. Ein wesentlich größerer Effekt ist bei den Transmembranproteinen Cytochrom b (42,7 kDa) und Cytochrom c₁ (27,6 kDa) zu beobachten. Bei zunehmender EDA-Menge wird das Laufverhalten von Cytochrom b stark beeinflusst und das Protein läuft schneller. Das Protein „überholt“ sogar das wesentlich kleinere Cytochrom c₁ bei MBA/EDA-Verhältnissen $\leq 0,25$ (Abb. 4.8).

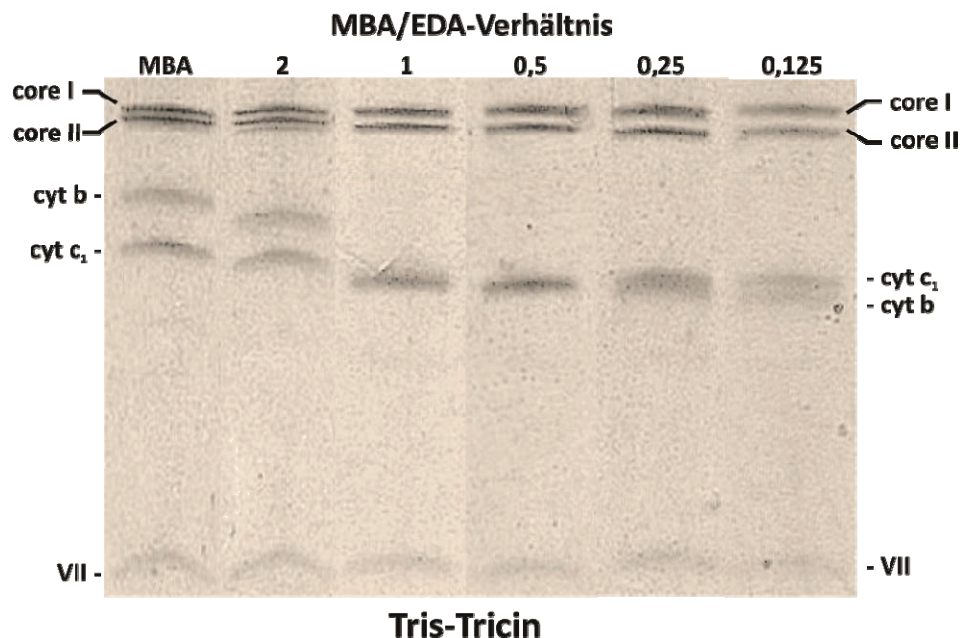


Abb. 4.8 Laufverhalten in Tris-Tricin Gelen mit unterschiedlichen MBA/EDA-Verhältnissen

Auftrennung eines d2Ant-Komplexes (2,5 µg \cong 10 pmol) mittels Tris-Tricin Gel: T= 16,5%, C= 2,6%; core I/II – Core Protein I/II; cyt b – Cytochrom b; cyt c₁ – Cytochrom c₁; VII – Untereinheit 7 (14 kDa)

4.2.2 Visualisierung von Proteinen im neuen Gelsystem

Färbetechniken für die Proteindetektion im Gel beruhen im Allgemeinen auf Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und dem im Gel eingebetteten Protein. Dementsprechend sollte der Austausch von MBA zu EDA als Quervernetzer keinen Einfluss auf den Färbeprozess haben. Da EDA- als auch MBA/EDA-Gele jedoch andere physikochemische Eigenschaften wie Standardgele haben, soll überprüft werden, ob verschiedene Färbemethoden mit dem neuen Gelsystem kompatibel sind oder ob sich Änderungen des Detektionslimits ergeben. Die Silberfärbung ist dafür bekannt, eine der empfindlichsten Methoden zu sein. Allerdings ist sie für ein EDA-enthaltendes Gel nicht geeignet. Für die Reduzierung von Silberkationen durch Formaldehyd sind alkalische Bedingungen nötig, unter denen die Esterbindung des EDAs hydrolysiert und somit die dreidimensionale Struktur des Gels zerstört wird. Nach kurzer Zeit entwickelt das Gel eine gummiartige Konsistenz, bis sich die Querverbindungen schließlich komplett aufgelöst haben. Um diesen Prozess zu verhindern, werden der Entwicklerlösung testweise organische Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol zugesetzt. Hierdurch wird jedoch auch der Färbeprozess stark verlangsamt, so dass sich kein Vorteil durch die Lösungsmittelzugabe ergibt.

Die Färbung mit kolloidalem CBB trägt nicht das Risiko des Auflöses, da sie unter sauren Bedingungen durchgeführt wird. Zwar können Ester auch in diesem Milieu hydrolysiert werden, allerdings sind hierfür harschere Bedingungen wie z.B. ein Erhitzen bis zum Sieden nötig. Durch eine Verdünnungsreihe des Proteingrößenmakers soll die Kompatibilität der CBB-Färbung mit dem neuen Gelsystem überprüft werden. Wird die Färbung der Proteine in Gelen mit gemischten *Crosslinkern* mit der der Standardgele verglichen, lassen sich keine Unterschiede erkennen. Die Hintergrundfärbung wie auch das Detektionslimit sind identisch. Dies wird z.B. durch den Nachweis der 6 ng-Bande des 50 kDa-Proteins (Abb. 4.9) veranschaulicht.

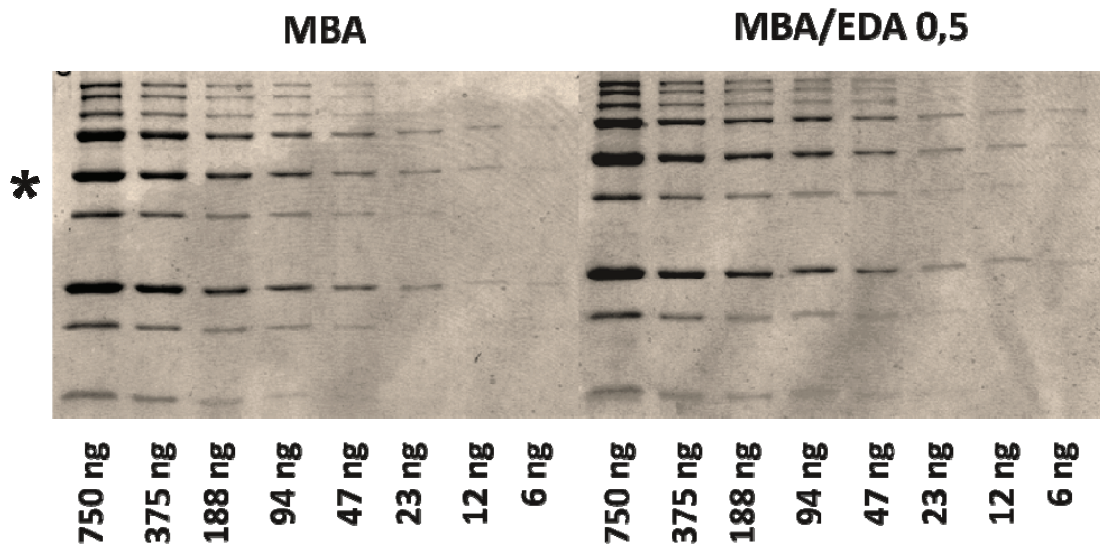


Abb. 4.9 Sensitivitätstest einer kolloidalen CBB-Färbung

Verdünnungsreihe des Proteinstandards; der Stern markiert die 50 kDa-Bande, auf welche die unten im Bild angegebenen Mengen zutreffen

Andere Visualisierungsmethoden wie die EZ-Färbung oder der Nachweis mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS werden ebenfalls bei saurem pH-Wert durchgeführt und sollten deshalb für gemischte Gele geeignet sein. Beide Färbungen sind mit den neuen Gelen kompatibel (Abb. 4.10). Das Detektionslimit der RuBPS-Färbung liegt im gleichen Bereich wie das der kolloidalen CBB-Färbung (6 ng beim 50 kDa-Protein) und zeigt keinen Unterschied zwischen normalen und MBA/EDA-Gelen. Die EZ-Technik lässt ebenfalls keine Differenz zwischen Standard- und gemischten Gelen erkennen. Die 6 ng-Bande des 50 kDa-Proteins kann aber in beiden Fällen nicht angefärbt werden.

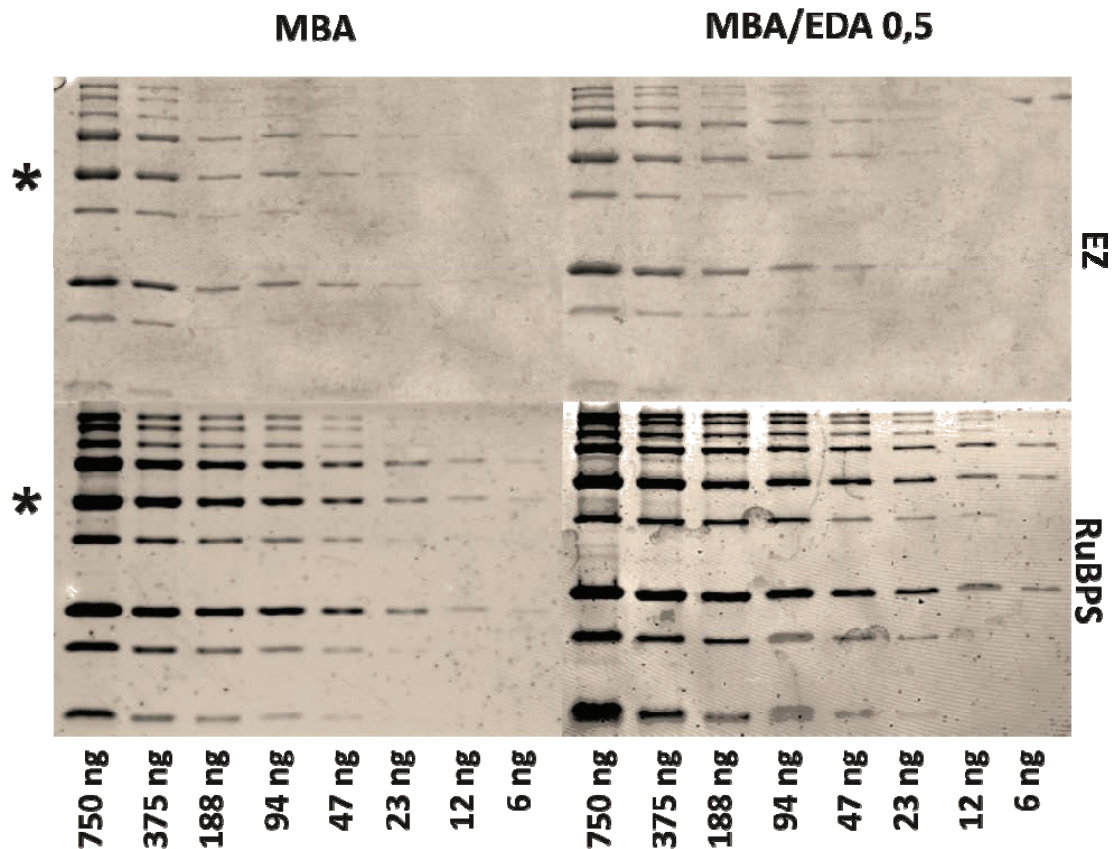


Abb. 4.10 Sensitivitätstest für die Farbstoffe EZ und RuBPS

Verdünnungsreihe eines durch EZ (oben) oder RuBPS (unten) angefärbten Proteinstandards. Der Stern markiert die 50 kDa-Bande, auf welche die unten im Bild angegebenen Mengen zutreffen

Ein weiterer Fluoreszenz-Farbstoff, das kommerziell erhältliche Lumitein, sollte ebenfalls für die Visualisierung von Proteinen im neuen Gelsystem geeignet sein, da auch diese Färbung in saurem Milieu durchgeführt wird (Abb. 4.11).

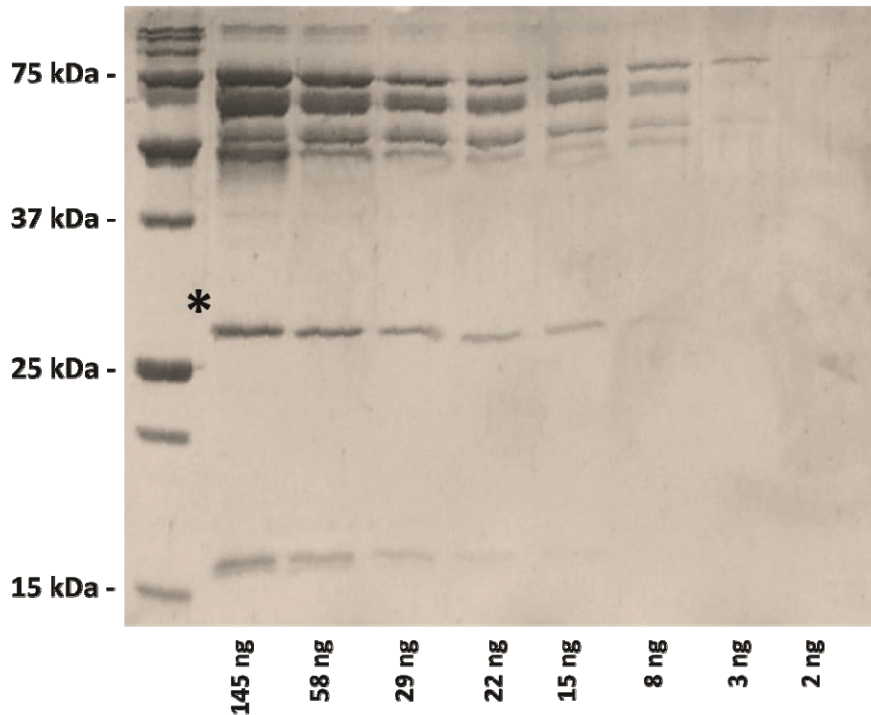


Abb. 4.11 Verdünnungsreihe einer Mischung aus Standardproteinen, angefärbt mit Lumitein
Sensitivität des Fluoreszenzfarbstoffs Lumitein, ermittelt durch eine Verdünnungsreihe verschiedener Standardproteine; Mengenangaben beziehen sich auf das Protein CAH (*); MBA/EDA 0,5

Die Anfärbung der Proteine mit Lumitein funktioniert. Größere Proteine wie beispielsweise Serotransferrin haben eine Sensitivitätsgrenze von ungefähr 9 ng/100 fmol. Kleinere Proteine wie Carboanhydrase haben ein höheres Detektionslimit, das nur bei ca. 15 ng/500 fmol liegt.

4.2.3 MALDI-MS nach der Esterhydrolyse durch Natronlauge

Das Aufweiten der Poren eines gemischten Gels, also eine Esterhydrolyse des spaltbaren *Crosslinkers*, lässt sich am schnellsten bei einem hohen pH-Wert durchführen, da die Kinetik dieser Prozedur eine Reaktion 2. Ordnung darstellt. Für den ersten Versuch der Esterhydrolyse wird 10 mM Natronlauge verwendet, also eine Base mit einem hohen pH-Wert (pH 12). 10 pmol BSA pro Gelbande werden wie in 3.7 beschrieben tryptisch verdaut. Das MALDI-Spektrum nach dem in-Gel Verdau zeigt sehr hohe Signale, die sich jedoch nicht dem analysierten Protein zuordnen lassen (Abb. 4.12A). Die BSA-Peptide, die sonst die höchsten Intensitäten im MS-Spektrum aufweisen (beispielsweise 927,49 oder 1479,79 Da), sind nur im unteren Drittel der Intensitätsskala zu finden. Zur Charakterisierung der höchsten Signale wird eine MS/MS-Messung durchgeführt. Nach der Fragmentierung des höchsten *Peaks* kann gezeigt werden, dass es sich um Natriumanlagerungen der Matrixcluster von CHCA (z.B. $\text{CHCA}+2\text{Na}^+$) handelt (Abb. 4.12B). Die oft detektierte Massendifferenz von 211 Da zwischen einzelnen Fragmentensignalen bestätigt dies, da dieser Wert durch die Abspaltung eines Moleküls $\text{CHCA}+\text{Na}^+$ erhalten wird. Auf einen großen Überschuss an Natriumionen kann ebenfalls geschlossen werden, weil deren Ionensignal (23 Da) den höchsten *Peak* des Spektrums darstellt. Trotz mehrmaligem Waschen nach der Natronlauge-Zugabe stören die Natriumionen also noch erheblich die MS-Messung. Zur Entfernung des Salzes wird eine ZipTip C18-Aufreinigung durchgeführt. Das danach aufgenommene Spektrum zeigt keine *Cluster* mehr, sondern die typischen BSA Peptide bei 927, 1479, 1639 Da etc. (Abb. 4.12C) mit einer der Probenmenge entsprechenden Intensität.

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass trotz relativ geringer Natriumhydroxidmenge, Waschen des Gelstücks und einer hohen Toleranz von MALDI gegenüber Salzen, Natronlauge nicht als Base zur EDA-Hydrolyse verwendet werden kann. Für die weiteren Versuche wird Ammoniumhydroxid eingesetzt, um Salzanlagerungen in Zukunft auszuschließen. Dieses muss jedoch in einer weitaus höheren Konzentration (~ 5M) zugegeben werden, um den benötigten pH-Wert zu erreichen.

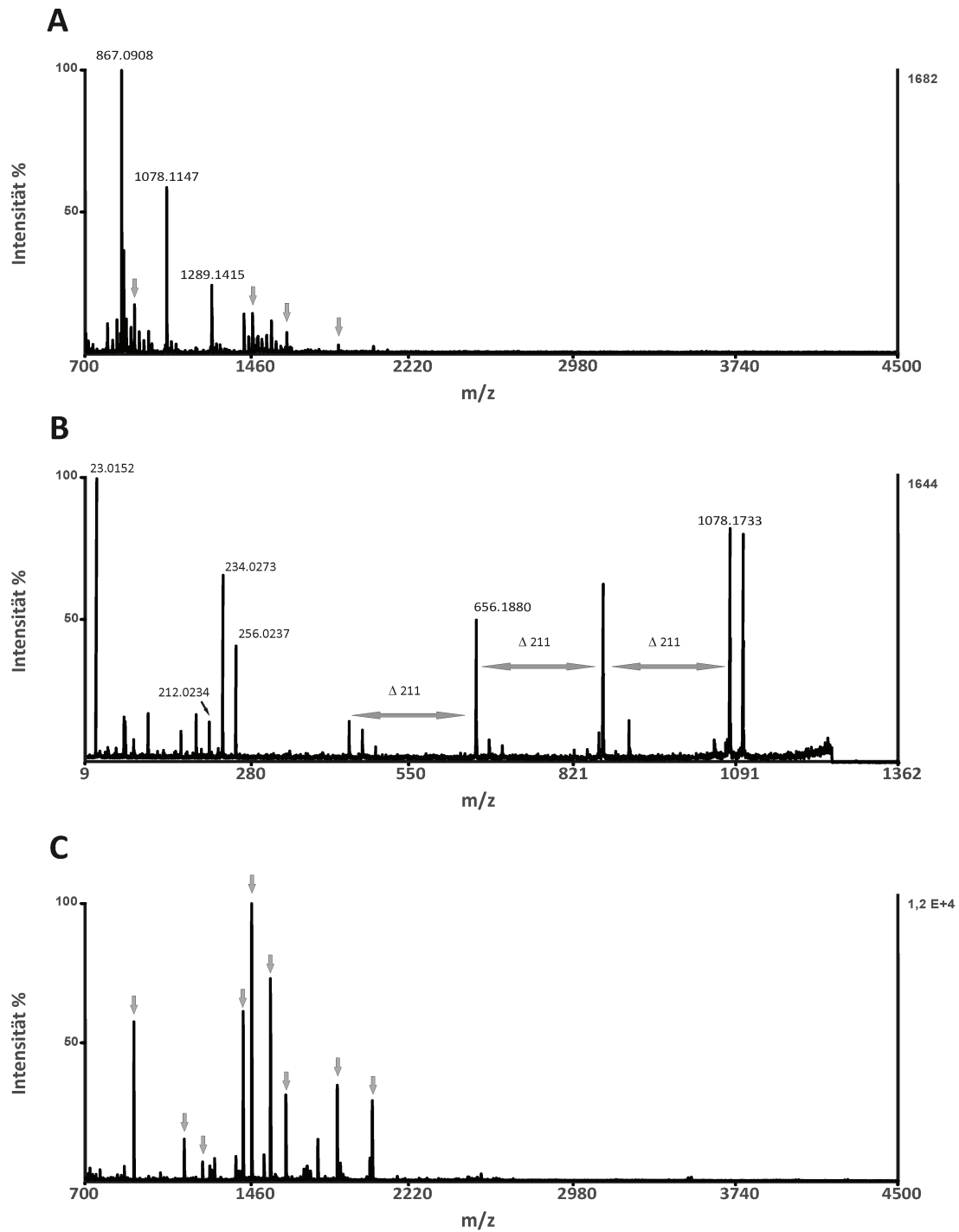


Abb. 4.12 MALDI-Spektren nach EDA-Hydrolyse durch Natronlaugezugabe

Probe: 10 pmol BSA pro Gelbande (A) PMF-Spektrum mit hohen Matrixclustern durch Na^+ -Anlagerungen (B) Fragmentierung des Peaks 1289,14 Da (C) PMF-Spektrum nach ZipTip C18-Aufreinigung; graue senkrechte Pfeile: dem BSA zugeordnete Signale

4.2.4 Tris-Glycin MBA/EDA-Gele mit T= 14% und C= 2,6%

Zur Herstellung der Gele mit gemischten *Crosslinkern* werden die Parameter T= 14% und C= 2,6% des Vergleichgels beibehalten. MBA und EDA werden in verschiedenen Verhältnissen von 2:1 bis 1:8 gemischt. Es werden jeweils vier Replikate von Standardproteinen (u.a. Carboanhydrase und Amylase) mit unterschiedlichen Konzentrationen pro Gelspur aufgetrennt und anschließend wie in Kapitel 3.7 vermerkt tryptisch verdaut. Durch die Spaltung des Quervernetzlers EDA werden die Gele von C= 2,6% auf C= 1,7% (2:1) bis hin zu C= 0,3% (1:8) erweitert. Auch bei dem kleinen Protein Myoglobin ist es – sowohl im Standard als auch in den gemischten Gelen – bei geringen Proteinmengen nicht möglich, Peptide zu detektieren. Im Diagramm sind nur Ergebnisse für Proben dargestellt, bei denen der Datensatz für alle sechs Gelsysteme (Abb. 4.13) vollständig ist. Die Daten zeigen keine Verbesserung des in-Gel Verdaus im Verhältnis zum Standard. Beim Vergleich von MBA/EDA-Misch- mit Referenzgelen ist bei gleichen T%- und C%-Werten die Peptidanzahl tendenziell sogar um so niedriger, je größer der EDA-Anteil ist.

Auch hinsichtlich anderer Qualitätsmerkmale sind keine Verbesserungen durch das neue Gelsystem zu verzeichnen. Die aufgenommenen Spektren zeigen bei identischen Peptiden ähnliche S/N-Werte, die Spektren von MBA/EDA-Mischgelen fallen lediglich durch einen erhöhtes Hintergrundrauschen auf, welches besonders im niedrigen Massenbereich störend wirkt. Ob dies durch das Gel an sich oder durch den Prozess des Aufweitens entsteht lässt sich nicht eindeutig klären. Ebenso zeigen sich Unterschiede zwischen beiden Systemen bei der Kristallisation der MALDI-Probenpräparation. EDA-Proben trocknen oft schlechter und bilden dann auch meist eine inhomogene Präparation aus. Durch Waschen, Rücklösen und Rekristallisieren kann zumindest dieses Problem beseitigt werden.

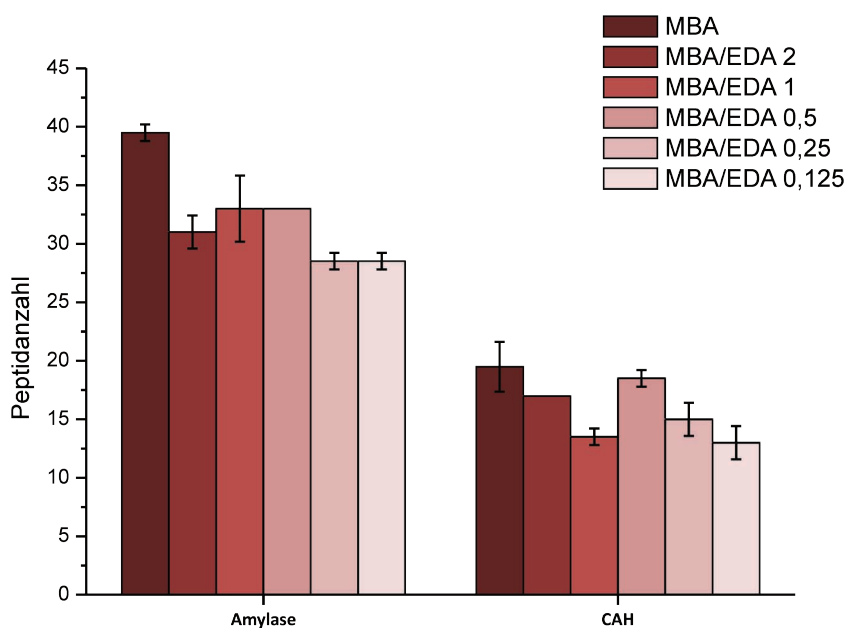


Abb. 4.13 Identifizierte Peptide aus Gelen mit unterschiedlichen MBA/EDA-Verhältnissen

Gelparameter: T= 14% und C= 2,6%; eingesetzte Proteinmenge pro Gelbande: 1 pmol (n=4)

4.2.5 Ammoniak-Inkubation

Aus den gewonnenen Resultaten des in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Versuchs wird geschlossen, dass mehrere Parameter zu einem Mangel an detektierbaren Peptiden führen können. Zum Einen könnte schon vor dem proteolytischen Verdau ein Proteinverlust stattfinden, und zwar durch Diffusion aus dem Gel während der Ammoniakinkubation. Außerdem ist es möglich, dass beim Waschen nach der Ammoniakzugabe ebenfalls Proteinverluste auftreten oder zu viel störende Salze entstehen. Um dies zu überprüfen wird das normale Protokoll (siehe Kapitel 3.7) modifiziert und die Hydrolysezeit auf 30 min bzw. eine Stunde verkürzt. Außerdem wird anstatt mit 25 mM Ammoniumbicarbonat mit Wasser gewaschen. Es werden gemischte Gele mit MBA/EDA 0,5 getestet.

Tab. 4.6 Per MALDI-MS ermittelte Peptidanzahlen für unterschiedliche Hydrolysezeiten

Gelparameter: T= 14% und C= 2,6%; MBA/EDA 0,5; angegebene Proteinmenge gilt pro Gelbande;

* - anstatt mit Ammoniumbicarbonat mit Wasser gewaschen; SD – Standardabweichung (n=4)

Protein	0,5h	SD	1h	SD	2h	SD	0,5h *	SD	1h *	SD	2h *	SD
500 fmol BSA	18,0	2,4	16,5	0,6	16,0	1,2	18,3	1,3	17,3	0,5	14,0	0,8
250 fmol BSA	9,8	0,5	10,5	1,0	8,3	1,3	10,0	0,8	8,3	1,3	11,0	1,4
500 fmol ADH	12,8	0,5	13,5	0,6	12,3	1,0	12,3	1,0	12,5	0,6	13,5	1,0
250 fmol ADH	4,8	1,5	7,3	1,3	6,5	0,6	6,0	0,8	4,8	0,5	6,0	0,8
500 fmol CAH	12,8	1,5	11,8	1,0	9,8	1,3	12,8	1,9	9,8	1,5	10,0	0,8
250 fmol CAH	3,8	1,0	5,3	0,5	3,8	1,3	4,5	0,6	4,0	0	3,8	1,0

Bei den drei getesteten Standardproteinen fällt auf, dass die Veränderung der Peptidanzahl minimal ist und im Rahmen der Standardabweichung liegt. Es ist kein allgemeiner Trend zu beobachten, die Peptidanzahl bei 500 fmol CAH und BSA nimmt jedoch leicht mit zunehmender Inkubationsdauer ab. Das Waschen mit Wasser anstatt mit Ammoniumbicarbonat scheint keinen nennenswerten Einfluss auf das Ergebnis des Verdaus zu haben, die Werte liegen auch hier im Bereich der Standardabweichung und streuen minimal.

Werden die Resultate dieses Versuchs mit denen eines Standardgels verglichen, schneidet das normale Gel besser ab. Um dies zu verdeutlichen werden die Ergebnisse für zwei unterschiedliche Probenmengen als Balkendiagramm dargestellt.

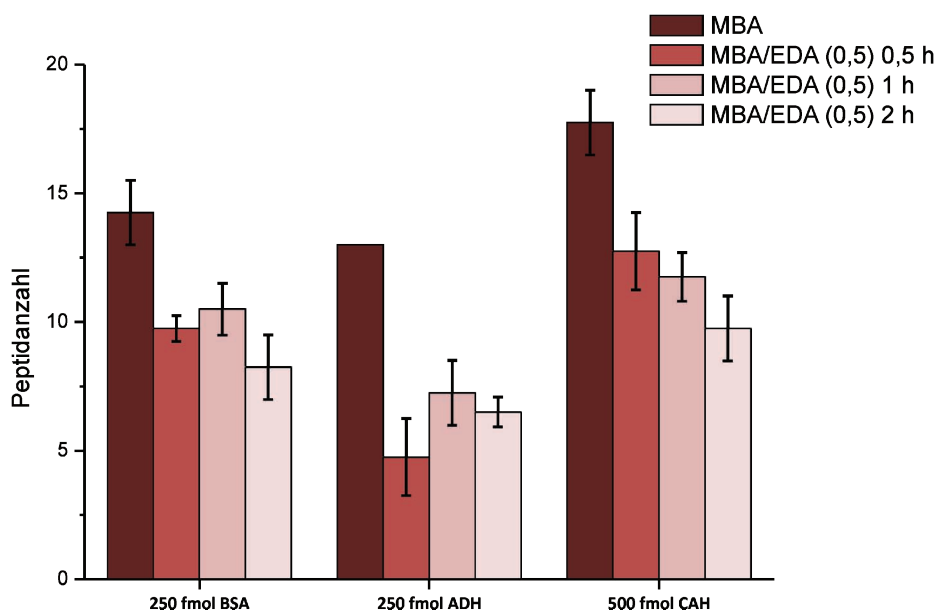


Abb. 4.14 identifizierte Peptide nach unterschiedlich langer Ammoniakinkubation

T= 14%, C= 2,6%; angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande (n=4)

Die in der Abb. 4.14 gezeigten Resultate bestätigen die in Kapitel 4.2.4 erzielten Ergebnisse. Die Peptidanzahl, die nach einem in-Gel Verdau aus einem Standardgel erhalten wird, ist höher als die des gemischten Gelsystems. Bei 250 fmol beträgt der Unterschied circa ein Drittel, ähnliches ist bei 500 fmol CAH zu sehen. Bei der Probe, die 250 fmol ADH enthält, ist die Peptidanzahl sogar um mehr als die Hälfte kleiner. Das neue Gelsystem ist also beim Vergleich der in-Gel Verdaus nicht gleichwertig.

4.2.6 Kolloidale CBB-Färbung in der Mikrowelle

Da die Anzahl der nachgewiesenen Peptide nicht den Erwartungen entsprechen, werden weitere mögliche Ursachen in Erwägung gezogen. Wie in Versuch 4.2.5 schon erwähnt ist es möglich, durch das Weiten des Gels auch Proteinverluste zu verursachen. Diese könnten auch schon beim Färben der Proteinbanden auftreten. Durch das starke Quellen der gemischten Gele wäre es möglich, dass die Proteine während des Färbeprozesses über Nacht aus dem Gel herausdiffundieren. Die Gele werden mit Hilfe einer normalen Haushaltsmikrowelle gefärbt, um den Färbeprozess zu verkürzen. Das Gel wird in einer Schale aus Glas für je 30 sec bei 800 Watt für insgesamt 5 min mit kolloidalem CBB gefärbt. Das Gel mit gemischten Quervernetzern quillt trotzdem erheblich, da auch dieser

Effekt in der Mikrowelle beschleunigt wird. Normale wie auch gemischte Gele zeigen eine starke Hintergrundfärbung, die nur durch eine längere Entfärbephase kompensiert werden kann. Für die alternativen Gele wird bei diesem Experiment das MBA/EDA-Verhältnis von 0,25 gewählt und nach der Färbung wie in Abschnitt 3.7 beschrieben tryptisch verdaut und per MALDI-PMF ausgewertet.

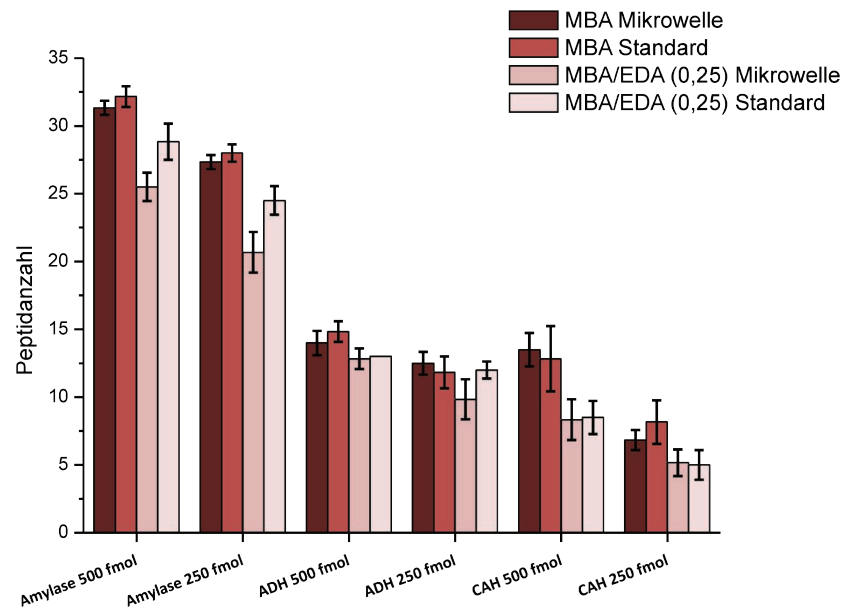


Abb. 4.15 Kolloidale CBB-Färbung in der Mikrowelle

T= 14%, C= 2,6%; angegebene Proteinmenge gilt pro Gelbande (n=6)

Wie aus dem Diagramm zu entnehmen kann die Färbung in der Mikrowelle mit kolloidalem CBB gegenüber der Standardfärbung als gleichwertig betrachtet werden. Die Anzahl der identifizierten Peptide ist nicht signifikant höher. Werden die Ergebnisse für das gemischte Gelsystem betrachtet, ist die Standardfärbung sogar von Vorteil. Am deutlichsten tritt dies beim Protein Amylase zu Tage. Beim Vergleich der Standardgele mit dem neuen Gelsystem zeigt sich, dass insgesamt keine Verbesserung der Ergebnisse durch die Mikrowellenfärbung erzielt werden kann.

4.2.7 Tris-Glycin MBA/EDA-Gele mit T= 14% und C= 4%

Da bisher alle Variationen im Arbeitsprozess keine Verbesserung des proteolytischen Verdaus gezeigt haben, werden nun die Gele selbst verändert. Der Parameter C% wird erhöht, damit die Geldichte vor dem Verdau größer ist und somit der potentielle Proteinverlust minimiert werden kann. Auch nach der Esterhydrolyse des EDAs ist der C%-Wert höher als in den vorherigen Experimenten. Es werden zwei verschiedene MBA/EDA-Verhältnisse gewählt: im ersten Fall reduziert sich C% nach der Spaltung des Quervernetzlers von 4% auf 2%, im zweiten Fall auf 1%. Als Vergleich dienen MBA-Standardgele mit den gleichen Parametern. Folgende Auswertung ergibt sich nach dem tryptischen Verdau und der massenspektrometrischen Analyse:

Tab. 4.7 Peptidanzahl nach PMF-Suche bei erhöhtem C%-Wert

Gelparameter: T= 14%, C= 4%; für 1 pmol (n=3); für 500 bzw. 250 fmol pro Bande (n=5); SD - Standardabweichung

Protein/ Menge	MBA	SD	MBA/EDA 1 4%→2%	SD	MBA/EDA 0,33 4%→1%	SD
Amylase:						
1 pmol	39,7	1,5	38,0	0	37,0	1,0
500 fmol	36,4	1,8	36,6	2,1	35,6	0,9
250 fmol	27,0	1,4	26,6	1,7	24,6	1,3
ADH:						
1 pmol	18,7	1,2	16,3	0,6	15,3	0,6
500 fmol	13,2	0,4	13,6	0,5	13,6	0,5
250 fmol	11,0	0	11,4	0,5	10,2	1,3
CAH:						
1 pmol	20,7	2,1	15,0	0	14,0	1,0
500 fmol	13,0	2,5	12,4	0,5	11,0	1,2
250 fmol	8,2	0,4	7,3	1,2	7,6	0,5

Die Anzahl der Peptide, die mittels PMF aus den verschiedenen Gelen identifiziert werden, sind in den meisten Fällen gleichwertig. Zwar nehmen die zugeordneten Peptide in den meisten Fällen mit zunehmender EDA-Menge ab, die Unterschiede liegen jedoch im Rahmen der Standardabweichung und sind nicht signifikant. Die Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen denen, die auch schon mit geringerer Geldichte erreicht wurden und zeigen nicht die erhoffte Verbesserung.

Desweiteren wird noch ein Versuch mit einem anderen Crosslinkerverhältnis unternommen (MBA/EDA 3). Der MBA-Anteil wird recht hoch gewählt, so dass die Aufweitung des Gels minimal ist und ein eventueller Proteinverlust unterbunden wird.

Wenn die Ergebnisse für diese Variation des *Crosslinker*-Anteils mit den erhaltenen Werten der anderen Gelmischungen aus Tab. 4.7 verglichen werden, werden minimal bessere Zuordnungen der Peptide erhalten. Diese liegen jedoch im Bereich der Standardabweichung und zeigen somit keine Verbesserung. Auch gegenüber den normalen MBA-Gelen wird erneut keine Steigerung erzielt.

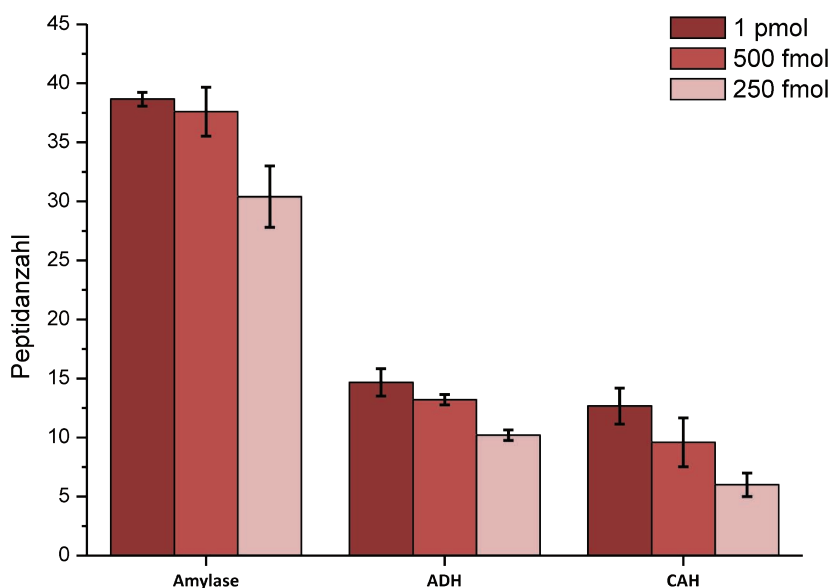


Abb. 4.16 PMF-Ergebnisse für gemischte Gele mit MBA/EDA 3

Gelparameter T= 14%, C= 4% (n=5); angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande

4.2.8 Variationen der Ammoniak-Menge und der Größe der Gelstücke

Es soll untersucht werden, ob weitere Modifikationen im Verdauprotokoll das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung beeinflussen und verbessern. Die in Kapitel 4.2.7 beschriebenen Gele mit T= 14%, C= 4% und einem MBA/EDA-Verhältnis von 1 werden für diesen Versuch verwendet. Zum Einen wird die Ammoniakzugabe von 100 μ l auf 25 μ l reduziert, um zu überprüfen, ob die verwendete Menge an Base das Verdauergebnis beeinflusst. Zum Anderen werden die Gelbanden nicht wie üblich in Würfel zerkleinert, sondern nur in zwei Stücke geteilt. Eventuell wird durch dieses Verfahren die Diffusion des eingeschlossenen Proteins verändert (weniger Oberfläche im Verhältnis zu den kleinen Stücken) und ein besseres Ergebnis erzielt. Ansonsten wird wie in Kapitel 3.7 erklärt tryptisch verdaut.

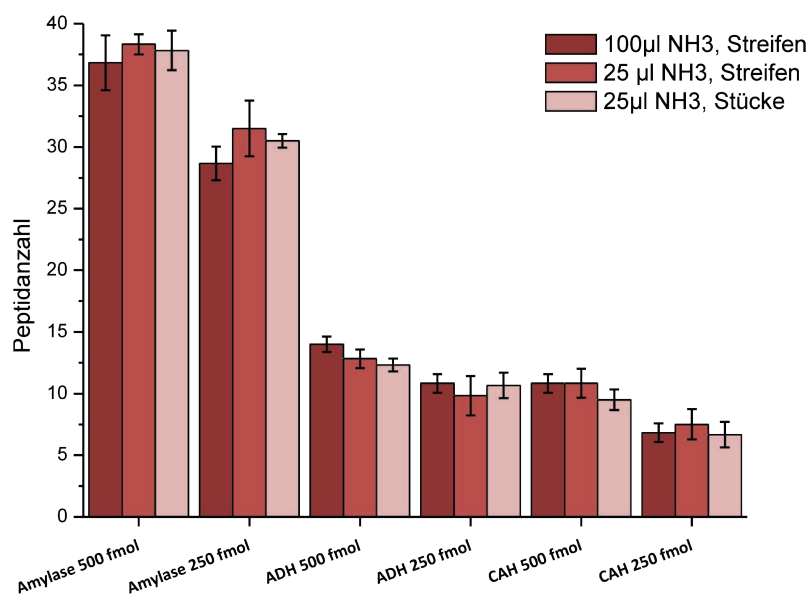


Abb. 4.17 Modifikation des Verdauprotokolls und der Gelgröße

Gelparameter T= 14%, C= 4%, MBA/EDA 1; angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande (n=6)

Die Resultate dieses Versuchs bringen die Erkenntnis, dass die Variation in der Ammoniakmenge keinen Einfluss auf das Verdauergebnis hat. Es werden keine signifikanten Unterschiede der identifizierten Signale erhalten. Auch die Größe der verdauten Geles beeinflusst die erhaltene Peptidanzahl nicht. Die zugeordneten Peptide im PMF sind sowohl für Streifen als auch für Stücke im Rahmen der Standardabweichung gleich. Auch wenn diese Ergebnisse denen in Tab. 4.7 dargestellten Werten gegenübergestellt werden, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem bereits etablierten Verdauprotokoll und keine Verbesserung gegenüber dem Standardgel.

4.2.9 Tris-Glycin MBA/EDA-Gele mit T= 16% und C= 5%

Bisher zeigen die Änderungen an Gelparametern und Verdauprotokoll keine Verbesserung der gemischten Gele im Vergleich zu normalen MBA-Gelen. Um potentielle Proteinverluste weiter zu minimieren, werden durch Erhöhung der T%- und C%-Werte gemischte Gele mit noch dichter Porengröße gegossen. Durch das engmaschigere Netz soll das Quellverhalten der MBA/EDA Gele vermindert werden und somit ein Verlust an Protein und Peptiden während der Färbe- und Verdauprozesse reduziert werden.

Gele mit T= 16% und C= 5% werden für diesen Versuch angefertigt. Für das neue Gelsystem werden verschiedene MBA/EDA-Mischungen verglichen, so dass nach der Esterhydrolyse ein C%-Wert von 3,5%, 3% und 2% erhalten wird. Die drei Standardproteine werden nach in Abschnitt 3.7 beschriebenem Protokoll einer tryptischen Proteolyse unterzogen. Folgendes Balkendiagramm zeigt die Anzahl der zugeordneten Peptide für Amylase:

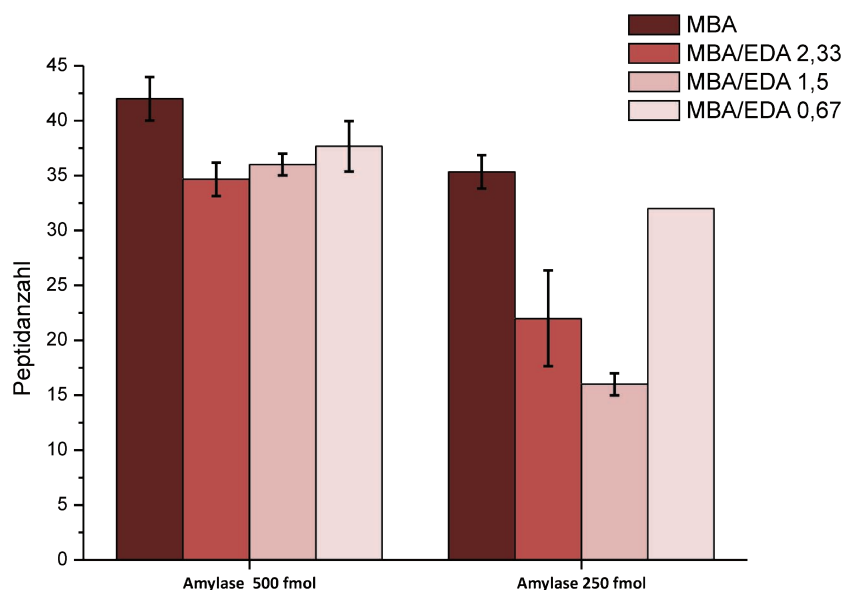


Abb. 4.18 PMF-Ergebnisse für Gele mit dichteren Gelporen

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; Proteinmenge gilt pro Gelbande (n=3)

Bei 500 fmol Amylase sind die Ergebnisse des Verdaus leicht schlechter als die des Standards. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Resultate bei der Probe von 250 fmol Amylase bei MBA/EDA-Verhältnissen von 2,33 und 1,67 wesentlich schlechter sind als die des Standardgels. Die Anzahl der identifizierten Peptide ist ungefähr 33% bis 50% schlechter. Besonders deutlich wird dies, wenn man die gesamten Ergebnisse dieses Versuchs betrachtet (Tab. 4.8).

Tab. 4.8 PMF-Ergebnisse für Gele mit dichteren Gelporen I

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; Proteinmenge gilt pro Gelbande (n=3); SD – Standardabweichung

Protein/ Menge	MBA		MBA/EDA 2,33 5%→3,5%		MBA/EDA 1,5 5%→3%		MBA/EDA 0,67 5%→2%	
	Peptide	SD	Peptide	SD	Peptide	SD	Peptide	SD
Amylase								
500 fmol	42,0	2,0	34,7	1,5	36,0	1,0	37,7	2,3
250 fmol	35,3	1,5	22,0	4,4	16,0	1,0	32,0	0
ADH								
500 fmol	18,7	1,5	14,7	0,6	16,0	0	16,3	1,5
250 fmol	18,3	1,5	10,3	2,9	6,7	0,6	15,7	0,6
CAH								
500 fmol	26,0	1,0	15,0	0	14,0	0	20,3	0,6
250 fmol	18,7	1,5	6,3	2,5	5,7	1,5	15,7	2,5

Vor allem bei den 250 fmol-Proben der Proteine ist eine große Differenz zum Standard zu erkennen. Da der Ertrag an Peptiden aus den Gelen mit MBA/EDA 0,67 den bisher ausgewerteten Daten der Dissertation entspricht (Resultate ein wenig schlechter als die der Standardgele, jedoch im Rahmen der Standardabweichung), muss davon ausgegangen werden, dass dies durch einen externen Faktor (z.B. Extraktion, MS-Messung etc.) und nicht durch das verwendete Gelsystem an sich verursacht wird.

Um ein vergleichbares Resultat für Gelsysteme mit MBA/EDA 2,33 und 1,5 zu erhalten, wird das Experiment mit diesen gemischten Gelen wiederholt.

Tab. 4.9 PMF-Ergebnisse für Gele mit dichteren Gelporen II

Gelparameter: T= 16, C= 5%; Proteinmenge gilt pro Gelbande (n=3); SD - Standardabweichung

	MBA		MBA/EDA 2,33		MBA/EDA 1,5	
	Peptide	SD	Peptide	SD	Peptide	SD
Amylase						
500 fmol	35,3	0,6	32,8	3,9	34,0	0,7
250 fmol	27,3	1,2	25,8	0,4	26,2	1,3
ADH						
500 fmol	14,3	0,6	15,2	0,4	15,4	0,5
250 fmol	9,3	0,6	13,0	1,2	12,6	0,9
CAH						
500 fmol	11,3	0,6	12,0	1,2	11,6	1,8
250 fmol	6,3	0,6	8,2	0,4	8,0	0

Wird nur dieses Experiment gesondert betrachtet, variieren die Ergebnisse leicht. Bei 500 fmol Amylase sind die normalen Gele leicht im Vorteil, während bei 500 fmol oder 250 fmol ADH die gemischten Gele mit MBA/EDA 2,33 besser sind. Fast alle Ergebnisse liegen wiederum im Rahmen der Standardabweichung, weichen aber von den ersten Resultaten ab (Tab. 4.8). Dies verdeutlicht die Problematik der Reproduzierbarkeit bei gelbasierten Versuchen. Die experimentellen Abweichungen betragen selbst bei optimalem Einhalten der Versuchsparameter vereinzelt über 30%. Der gesamte Ablauf von Elektrophorese bis zur massenspektrometrischen Messung ist von sehr vielen Einzelfaktoren abhängig (z.B. Art des Ausschneidens, unterschiedliches Färbeverhalten, Polymerisation des Gels, Zustand der Probenlösung etc.), so dass nur die Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe miteinander verglichen werden können.

4.2.10 Tris-Tricin MBA/EDA-Gele mit T= 16,5% und C= 6%

Es konnte schon gezeigt werden, dass Gele mit gemischten Quervernetzern zur Herstellung von Tris-Tricin Gelen anwendbar sind (Kapitel 4.2.1). Es ist bisher jedoch noch keine Messung eines tryptischen Verdaus untersucht worden. Hierzu werden 750 fmol einer d2Ant-Lösung auf Gele mit unterschiedlichen *Crosslinker*-Zusammensetzungen aufgetragen (T= 16,5%, C= 6%, MBA/EDA 1,4; 1 und 0,5). Sechs Untereinheiten werden ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.7 dargestellt tryptisch verdaut.

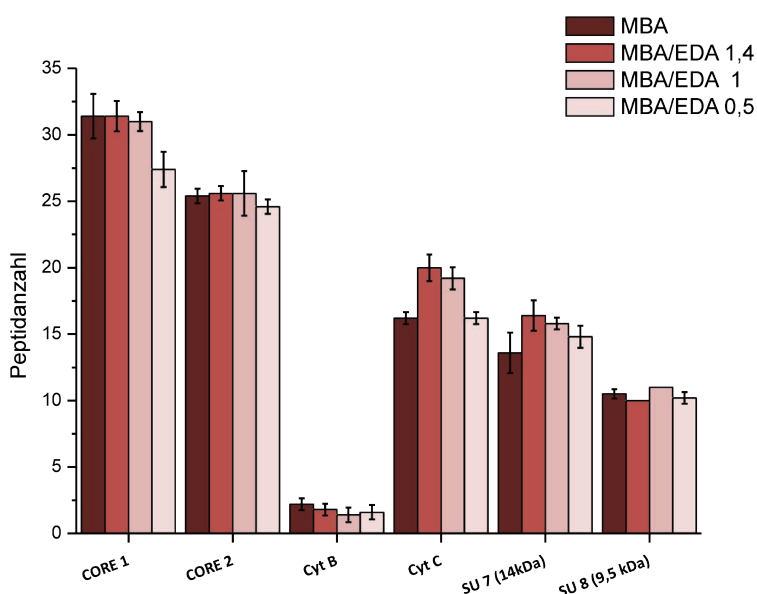


Abb. 4.19 PMF-Ergebnisse für Untersuchung des d2Ant-Komplexes

Gelparameter: T= 16,5%, C= 6%; Proteinmenge 750 fmol pro Gelbande (n=5); CORE 1/2 – Core Protein I/II; Cyt b – Cytochrom b; Cyt C – Cytochrom c₁; SU 7 – Untereinheit 7 (14 kDa); SU 8 – Untereinheit 8 (9,5 kDa)

Wie in vorher beschriebenen Ergebnissen für in-Gel Verdaus aus Tris-Glycin Gelen, bietet sich hier ein ähnliches Bild. Die Anzahl der zugeordneten Peptide der einzelnen Untereinheiten des Komplexes ist von Gelsystem zu Gelsystem nicht signifikant unterschiedlich. Eine Ausnahme stellt das Protein Cytochrom c₁ dar, da bei Gelen mit MBA/EDA 1,4 und 1 vier Peptide mehr identifiziert werden, was einer Steigerung von 20% entspricht.

4.2.11 Tris-Glycin EDA-Gele: Vorteile der starken Quellung?

Wie anfangs schon erwähnt ist es nicht möglich, die Vorteile der Esterhydrolyse für ein Gel anzuwenden, das nur EDA als Quervernetzer enthält. Die zurückbleibenden Acrylamidfäden bewirken, dass eine dickflüssige Lösung entsteht und eine direkte massenspektrometrische Analyse nicht möglich ist. Da pure EDA-Gele jedoch zu einem ausgeprägten Quellverhalten neigen, könnte dies auch ohne Spaltung des *Crosslinkers* schon zu einer erheblichen Vergrößerung der Gelporen führen. Aus diesem Grund werden in-Gel Verdau von puren EDA-Gelen nach dem Standardprotokoll unternommen. Außerdem wird zusätzlich untersucht, ob das gesteigerte Quellverhalten ausgenutzt werden kann, indem ein Teil der Gelstücke vor dem Verdau einen Tag in Wasser bzw. in einem leicht basischen Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 9,6) inkubiert wird. Der Einfluss dieses Puffers auf den Verdau wird auch bei Standardgelen überprüft.

Tab. 4.10 PMF-Ergebnisse für in-Gel Verdau aus puren EDA-Gelen

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande; SD – Standardabweichung

*- Puffer pH 9,6; † - 24 h quellen in H₂O; *† - 24 h quellen in Puffer pH 9,6 (n=3)

Protein/ Menge	MBA	SD	MBA *	SD	EDA †	SD	EDA *†	SD	EDA	SD	EDA *	SD
Amylase												
500 fmol	34,3	2,1	33,0	2,0	29,7	2,9	32,0	2,0	34,3	2,1	30,7	0,6
250 fmol	26,7	2,1	27,3	1,2	21,0	1,7	25,0	2,0	24,3	1,5	23,7	4,2
ADH												
500 fmol	15,0	0,0	16,0	0	14,7	1,2	16,0	1,0	15,0	1,0	14,0	1,0
250 fmol	11,7	1,2	11,3	0,6	12,7	3,8	13,3	0,6	11,7	1,5	15,3	1,5
CAH												
500 fmol	17,3	2,1	16,3	1,5	16,0	3,6	14,0	2,0	14,7	0,6	12,0	1,0
250 fmol	7,3	0,6	7,0	1,0	12,0	3,6	11,7	2,5	9,3	1,2	8,3	2,1

Um die Ergebnisse im Einzelfall noch einmal zu verdeutlichen, sind sie zusätzlich als Balkendiagramme dargestellt:

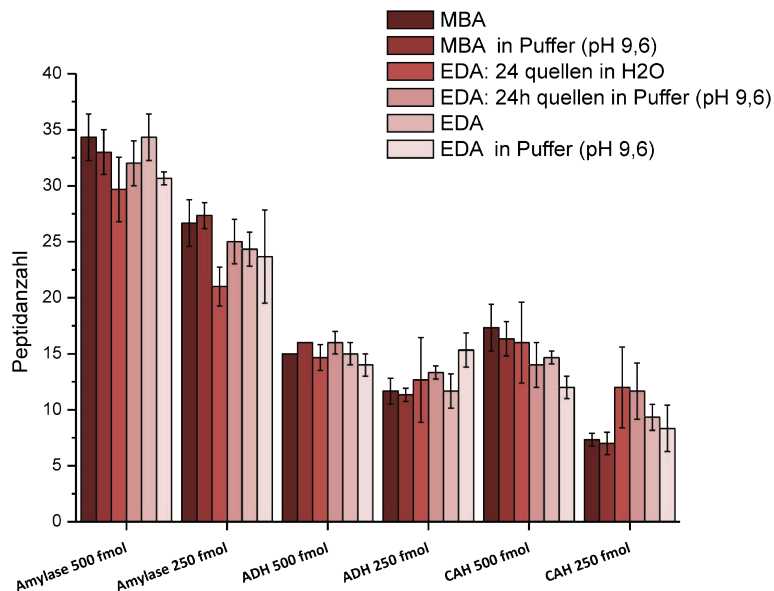


Abb. 4.20 PMF-Ergebnisse für in-Gel Verdau in puren EDA- Gelen

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande (n=3)

Die Resultate zeigen, dass ein Verdau in einem puren EDA-Gel möglich ist und auch gleichwertige Ergebnisse wie in einem Standardgel erzielt werden können. Insgesamt werden, trotz unterschiedlichen Pufferbedingungen und Quellzeiten, keine signifikant unterschiedlichen Effekte die Peptidanzahl betreffend festgestellt. Allerdings sind zum Teil deutlich größere Standardabweichungen zu verzeichnen.

4.2.12 PMF-Ergebnis nach Lumitein-Färbung

Auf der Suche nach einer sensitiveren kompatiblen Visualisierungsmethode wird die kommerziell erwerbliche Fluoreszenz-Färbung mit Lumitein getestet. Diese besitzt nur eine kurze Expositionszeit mit der Färbelösung, so dass eventuelle Probenverluste während des Quellvorgangs reduziert werden könnten. Da in der Produktbeschreibung kein spezielles Lösungsmittel zum Entfärben angegeben ist, wird das normale Verdauprotokoll angewendet. Folgende Tabellen zeigen die Ergebnisse der Lumitein-Färbetechnik und dem standardmäßig verwendeten kolloidalen CBB.

Tab. 4.11A PMF-Ergebnisse Lumitein-gefärbter Gele

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; SD – Standardabweichung; angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande (n=4)

Protein/ Menge	MBA	SD	MBA/EDA 2,33	SD	MBA/EDA 0,67	SD	EDA	SD
HSA								
500 fmol	25,5	1,3	25,8	1,5	36,0	3,6	14,3	1,3
250 fmol	17,5	3,7	17,3	0,5	22,5	1,3	11,0	2,0
Amylase								
500 fmol	19,8	1,0	18,5	0,6	20,5	1,3	12,5	1,3
250 fmol	15,5	0,6	13,5	0,6	14,5	1,0	5,8	0,5
CAH								
500 fmol	11,3	0,5	9,3	1,0	11,5	1,3	5,8	1,0
250 fmol	8,3	1,2	4,3	0,5	7,8	0,5	3,5	1,0

Tab. 4.11B PMF-Ergebnisse kolloidal CBB-gefärbter Gele

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; SD – Standardabweichung; angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande (n=4)

Protein/ Menge	MBA	SD	MBA/EDA 2,33	SD	MBA/EDA 0,67	SD	EDA	SD
HSA								
500 fmol	34,5	1,3	32,5	0,6	36,0	0,8	27,5	1,7
250 fmol	22,0	3,4	26,5	3,7	28,3	0,5	14,3	2,1
Amylase								
500 fmol	36,0	1,8	33,8	1,0	39,5	1,0	32,8	1,0
250 fmol	27,5	0,6	32,3	3,1	29,0	0,8	24,5	2,4
CAH								
500 fmol	17,0	1,4	15,3	0,5	15,0	0	14,5	0,6
250 fmol	12,0	0,8	12,3	1,3	9,8	1,0	8,3	1,0

Um den Unterschied in der gefundenen Peptidanzahl zwischen den beiden Färbungen herauszuheben, werden die Werte bei 500 fmol Amylase und 250 fmol HSA als Balkendiagramme dargestellt.

Es kann eindeutig gezeigt werden, dass die Fluoreszenzfärbung mit Lumitein nicht in dem Maße MS-kompatibel ist wie die kolloidale CBB-Färbung. Trotz wesentlich kürzerer Färbezeit und damit verbundener Einschränkung des Quellvorgangs können keine besseren PMF-Ergebnisse erzielt werden. Im Gegenteil, für einige Proteine (siehe Abb. 4.21) werden mit der kolloidalen CBB-Färbung fast doppelt so viele Signale zugeordnet.

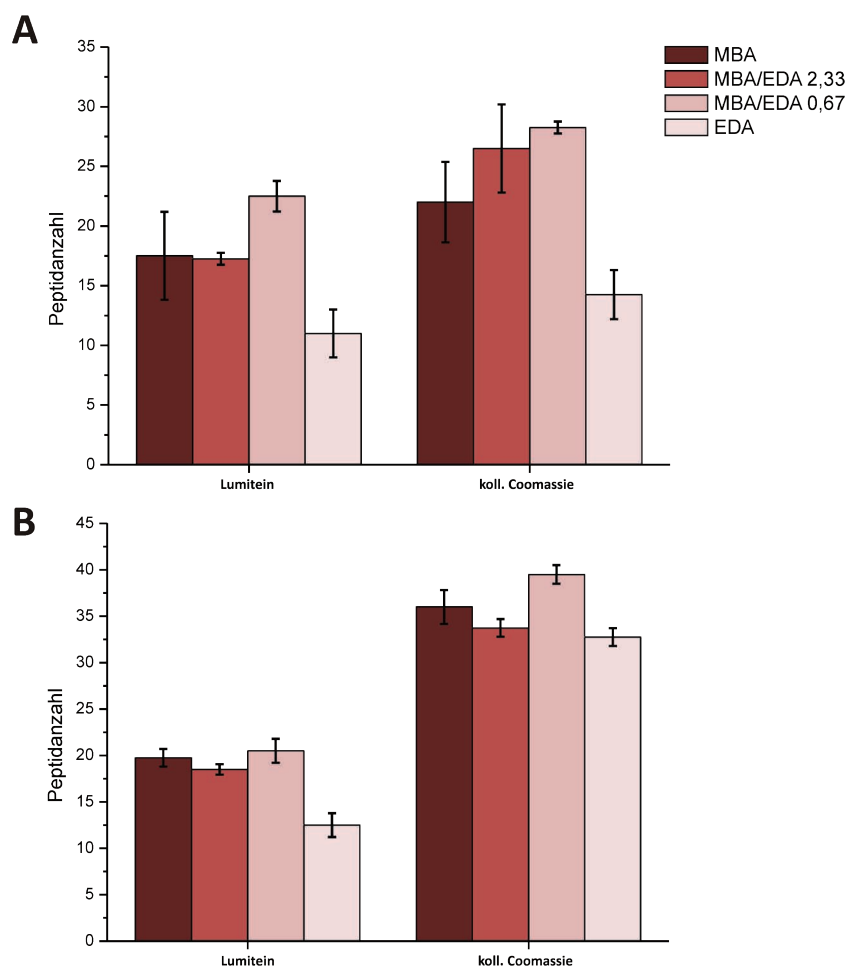


Abb. 4.21 Vergleich der PMF-Resultate von Lumitein- und CBB-gefärbten Gele

Gelparameter: T= 16%, C= 5%; PMF-Ergebnisse für (A) 250 fmol HSA und (B) 500 fmol Amylase, angegeben ist die Proteinmenge pro Gelbande (n=4)

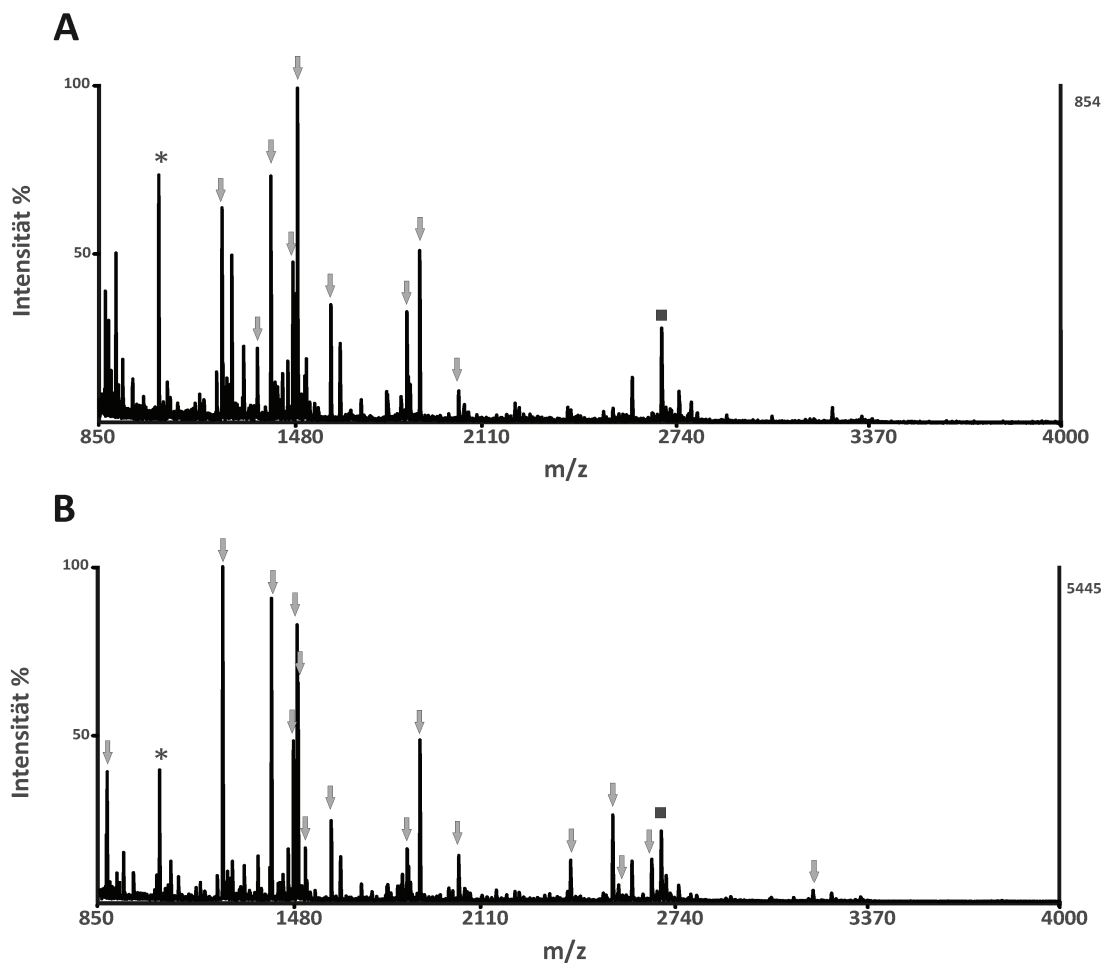


Abb. 4.22 Spektren von einer Lumitein- und einer kolloidalen CBB-gefärbten Probe

Gelparameter: T= 16%, C= 5%, MBA/EDA 0,67; Spektren von 500 fmol Amylase/Gelbande nach (A) Lumitein und (B) koll. CBB-Färbung; graue Pfeile - Amylase Peptide, *-Trypsinpeptid, ■ - Keratinpeptid

In Abb. 4.22 haben die Peptidsignale im CBB-Spektrum (B) eine 7-mal höhere Intensität als im Spektrum nach Lumitein-Färbung (A). Auch sind in Spektrum (A) mehr Rauschsignale und Störpeaks. Lumitein ist also zumindest für die massenspektrometrische Analyse von regulären wie auch den neuen Gelen nur bedingt geeignet und deutlich schlechter als kolloidales CCB.

4.2.13 Adaptierte Gele mit gemischten *Crosslinkern*

Durch die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und die verschiedenen Moleküllängen ist es wahrscheinlich, dass Gele die EDA enthalten, schon vor der Esterhydrolyse größere Gelporen besitzen als MBA-Gele. Dies kann man aus dem unterschiedlichen Laufverhalten der Standardproteine schließen. Es wird nun versucht, Gele mit gemischten Quervernetzern engporiger zu machen, um das Laufverhalten, d.h. die Migrationsgeschwindigkeit und die Auflösung und Schärfe der Banden an normale Standardgele mit MBA als *Crosslinker* anzupassen. Nur so ist eigentlich eine valide Aussage möglich, da nur bei analytisch vergleichbarer Trennleistung die Ergebnisse gegenübergestellt werden können. Eine zusätzliche Hoffnung besteht darin, durch die Verkleinerung der Gelporen einen Proteinverlust auszugleichen und hierdurch die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse zu verbessern. Gelmischungen mit verschiedenen *Crosslinker*-Verhältnissen und einer größeren Menge an Quervernetzer und Acrylamid insgesamt werden getestet, d.h. dass im Vergleich zum 14% T/2,6% C-Standardgel sowohl der T%- als auch der C%-Wert erhöht werden.

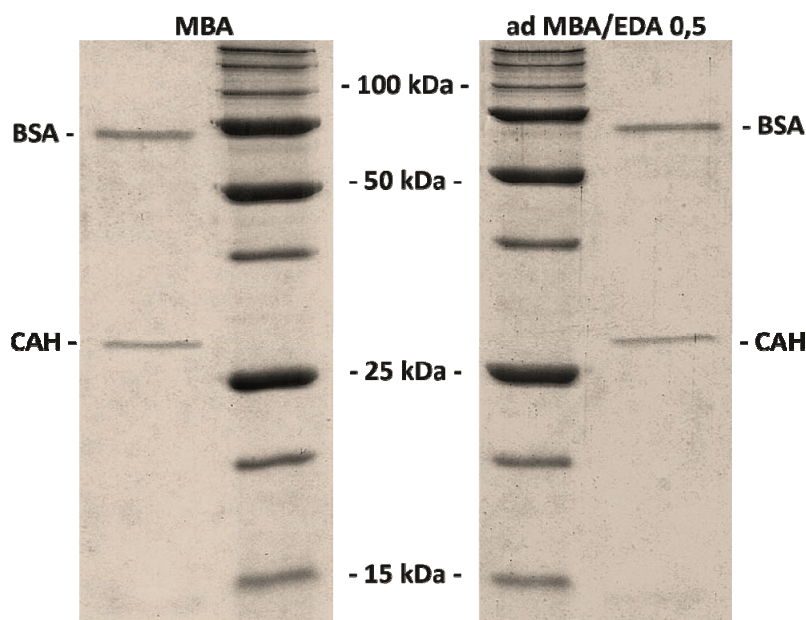


Abb. 4.23 Laufverhalten von Proteinen im adaptierten Tris-Glycin MBA/EDA-Gelsystem

Tris-Glycin: Gelparameter: Standard 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5.

Nach Adaptieren der Gele mit gemischten *Crosslinkern* durch empirische Bestimmungen werden für die ideale Mischung folgende Werte erhalten: 15,3% T/3,9% C mit einem MBA/EDA-Verhältnis von 0,5. Mit diesen Parametern wird im Vergleich zum Standardgel eine ähnliche Auflösung erreicht. Lediglich die Laufzeit muss um circa 10% erhöht werden, um das gleiche Gelbild zu erhalten (Abb. 4.23). Die ermittelten Werte gelten für das Tris-Glycin-Gelsystem. Der T%-Wert wird circa um 10% (14% → 15,3%), der C%-Wert um circa 45% (2,6% → 3,9%) erhöht. Werden diese Richtwerte auf ein Tris-Tricin Gel mit T= 16,5% und C= 2,6% übertragen, werden neue Werte von T= 18,4% und C= 3,8% erhalten. Unter Berücksichtigung dieser Parameter können Gele mit gemischten *Crosslinkern* gegossen werden, in denen Proteine die gleichen Laufeigenschaften wie im als Grundlage dienenden Standardgel haben (Abb. 4.24). Somit ist das System mit den adaptierten Werten auch auf Tris-Tricin-Gele anwendbar.

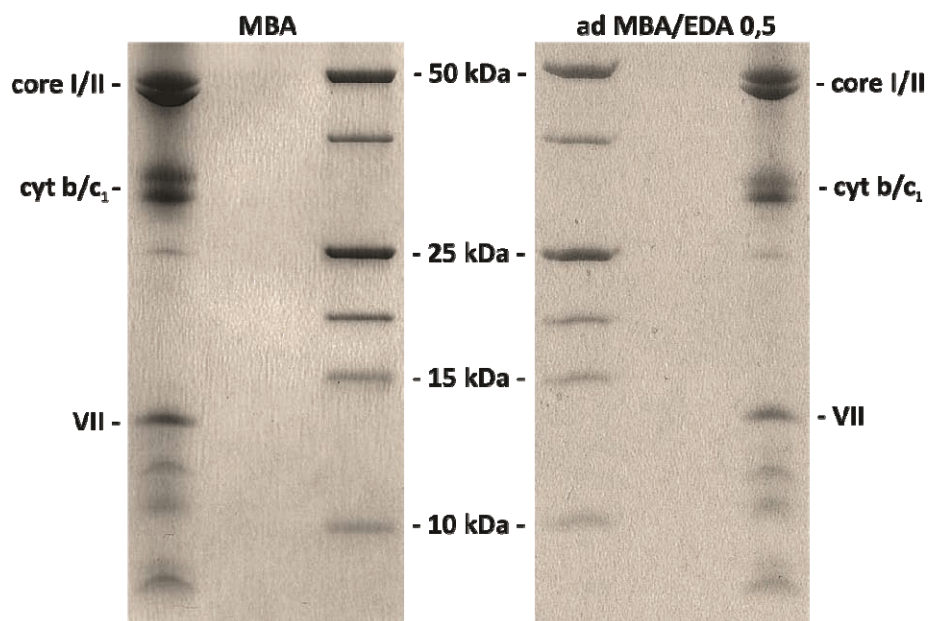


Abb. 4.24 Laufverhalten von Proteinen im adaptierten Tris-Tricin MBA/EDA-Gelsystem

Tris-Tricin: Gelparameter: Standard 16,5% T/2,6% C; adaptiert 18,39% T/3,79% C MBA/EDA 0,5
 d2Ant-Probe: Untereinheiten core I/II, cyt b/c₁ – Cytochrom b und c₁, VII – Untereinheit VII

Für fünf Standardproteine, die mittels Tris-Glycin SDS-PAGE (1 pmol pro Gelbande) aufgetrennt werden, wird ein massenspektrometrischer Vergleich durch PMF-Analyse zwischen einem adaptierten gemischten (15,3% T/3,9% C mit MBA/EDA 0,5) und einem Standardgel (14% T/2,6% C) unternommen. Der C%-Wert der gemischten Gele wird durch die Esterhydrolyse von EDA von 3,9 auf 1,3% gesenkt, was die Proteolyse des Substrats durch das Enzym und die Peptidextraktion erleichtern sollte. Die anschließende massenspektrometrische Untersuchung zeigt eine deutliche Verbesserung der PMF-Ergebnisse. Die Anzahl der zugeordneten Peptide steigert sich um 16,5% für Amylase bis zu 89,5% bei BSA (Abb. 4.25A). Die damit verbundenen Werte des Mascot Protein-Scores und der Sequenzabdeckung verbessern sich dementsprechend (Abb. 4.25B,C).

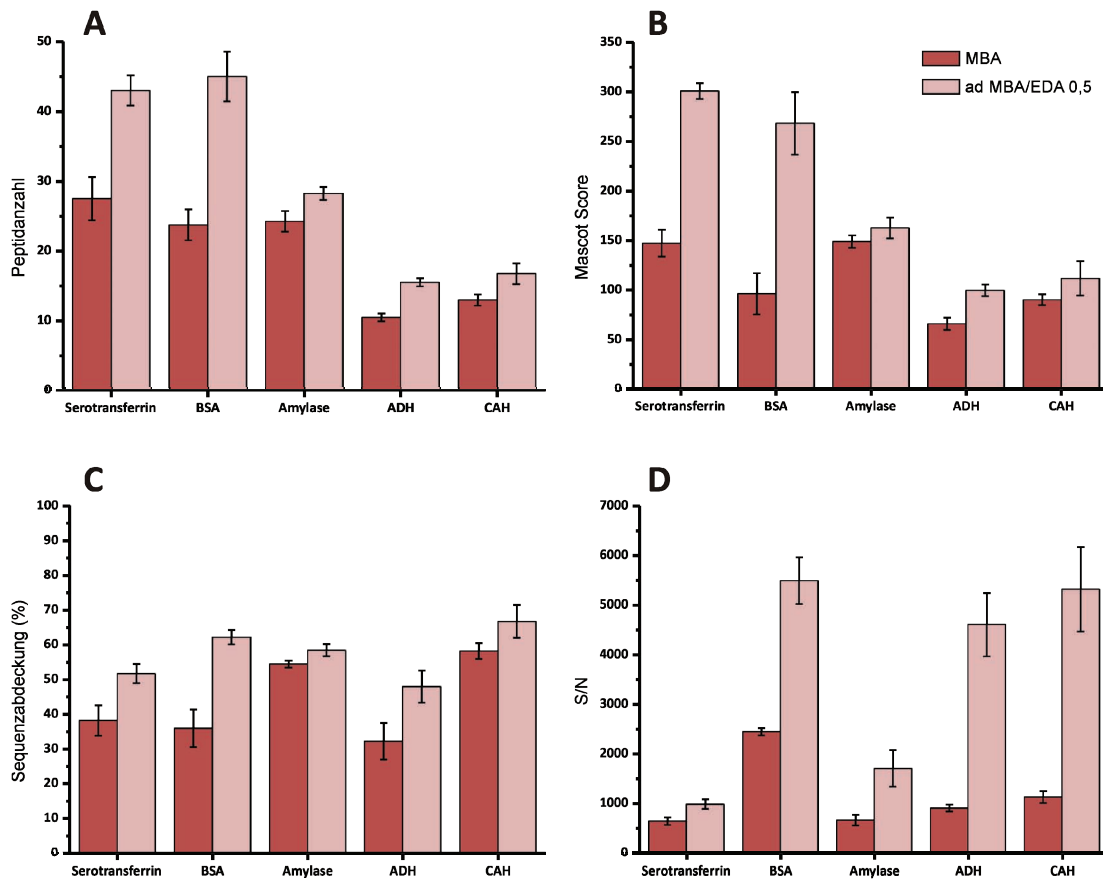


Abb. 4.25 PMF-Vergleich zwischen MBA- und adaptierten MBA/EDA-Gelen

Gelparameter: MBA: 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5 (A) Anzahl der gefundenen Peptide, (B) Mascot Protein-Score (C) Sequenzabdeckung und (D) S/N des Base Peaks; 1 pmol Protein pro Gelbande

Der Informationszuwachs ist vor allem auf die deutlich besseren S/N-Werte der aus den gemischten Gelen extrahierten Peptide zurückzuführen. Der S/N-Wert des höchsten Signals aller fünf Proteine ist wesentlich höher als der der Standardgele (Abb. 4.25D). Außerdem sind die MS-Signalintensitäten der am häufigsten zu findenden Peptide circa 3 bis 5 mal höher als die der Kontrolle.

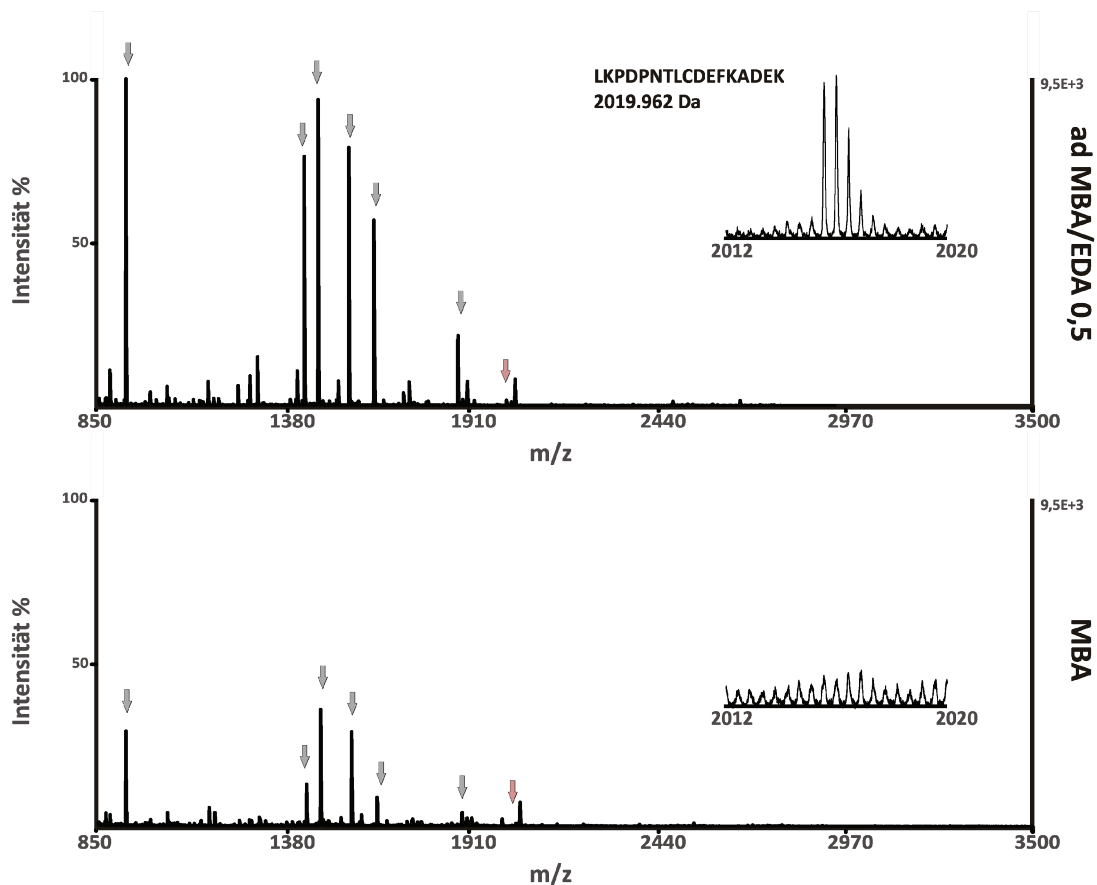


Abb. 4.26 Vergleich der MS-Spektren einer BSA-Probe

Tris-Glycin: Gelparameter: MBA 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5; Proteinmenge: 1 pmol/Gelbande; grauer Pfeil – ausgewählte BSA-Peptide; roter Pfeil – vergrößerter Bereich

In Abb. 4.26 ist zu erkennen, dass die Signale im oberen BSA-Spektrum circa 3 mal so hoch sind wie in dem der MBA-Kontrolle. Die besseren S/N-Werte werden durch den eingezoomten Bereich verdeutlicht. Die Abb. 4.27 demonstriert, dass diese Vorteile nicht nur für BSA zutreffen.

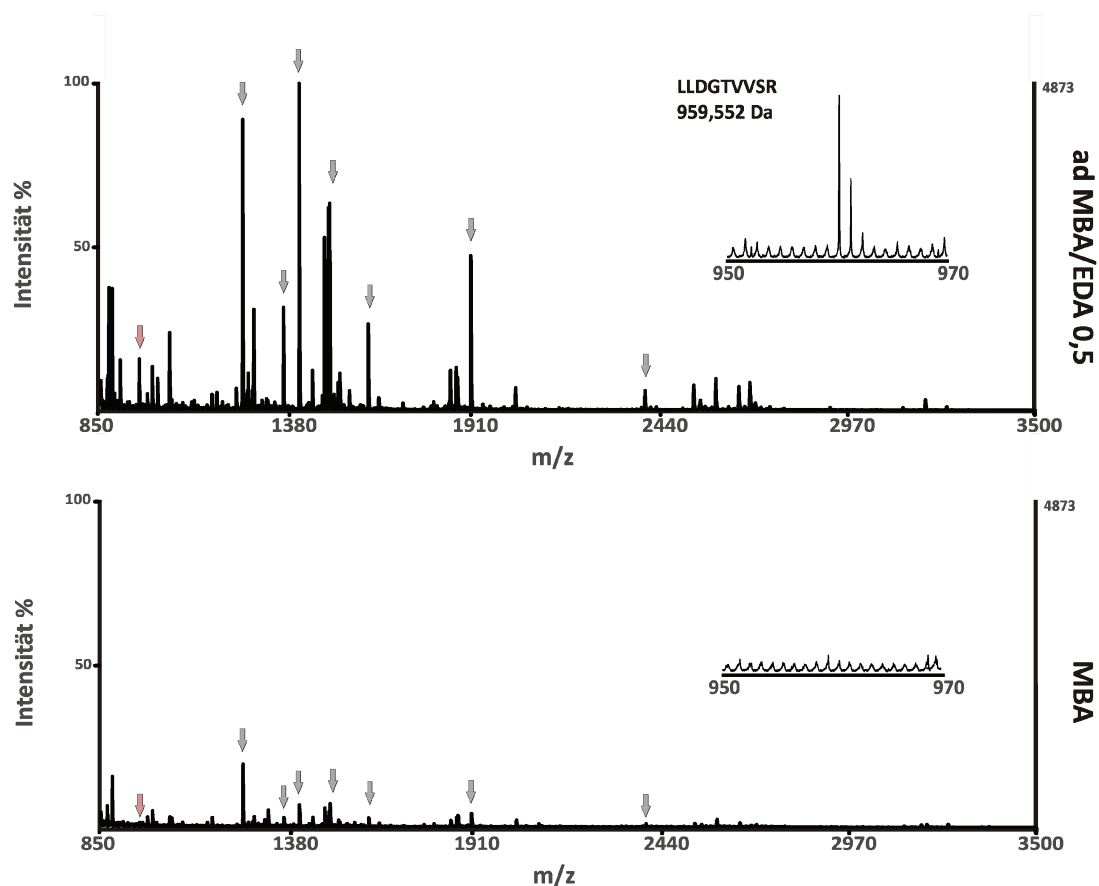


Abb. 4.27 Vergleich der MS-Spektren einer Amylase-Probe

Tris-Glycin: Gelparameter: MBA 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5; Proteinmenge 1 pmol/Gelbande; graue Pfeile – ausgewählte Amylase-Peptide; roter Pfeil – vergrößerter Bereich

Auch in dieser Abbildung, die die Aufnahme einer Amylase-Probe zeigt, wird die Verbesserung der Spektrenqualität deutlich. Hier nimmt die Signalintensität sogar um den Faktor 5 zu. Die zugeordneten Peptide aller oben aufgeführten Proteine sind in den Tabellen Tab. 9.1 bis 9.5 dargestellt.

Auch für kleine Proteinmengen wird ein Vergleich unternommen. Für das Protein BSA werden 250 bzw. 50 fmol Probe pro Bande auf das Gel aufgetragen. Da die kolloidale CBB-Färbung jedoch nicht so sensitiv ist, um diese Proteinmengen zu erfassen, werden parallel 1 pmol Proben aufgetrennt und dann auf gleicher Höhe mit diesen Proteinbanden ausgeschnitten und wie in Abschnitt 3.7 beschrieben tryptisch verdaut. Die Auswertung der PMF-Daten zeigt folgendes:

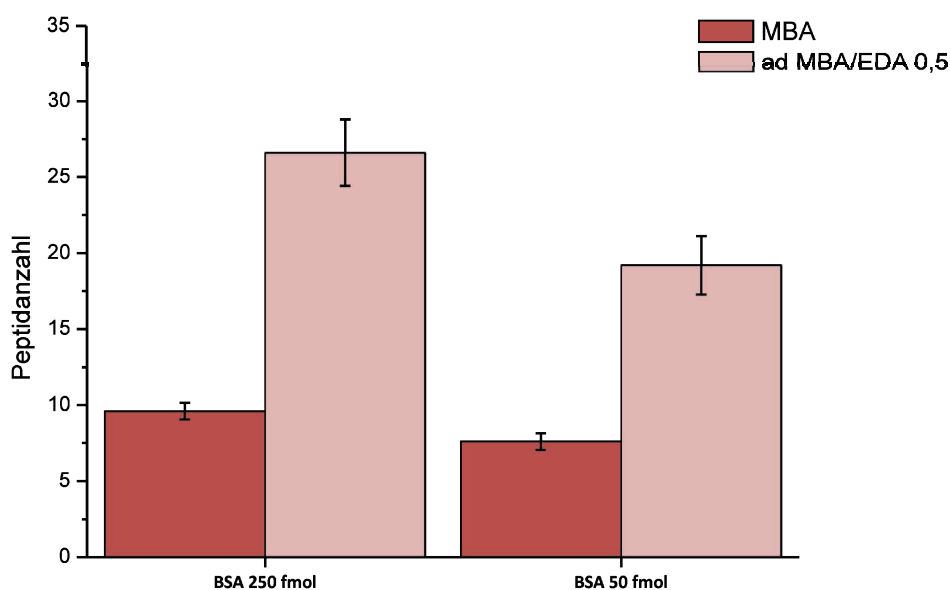


Abb. 4.28 Vergleich des Nachweises kleiner Proteinmengen zwischen Standard- und adaptiertem MBA/EDA-Gel

Gelparameter: MBA: 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5; angegebene Proteinmenge gilt pro Gelbande (n=3)

Auch für kleine Proteinmengen kann eine Überlegenheit der adaptierten MBA/EDA-Gele festgestellt werden. Diese zeichnet sich durch eine Erhöhung der Anzahl der zugeordneten Signale aus, die circa 3 mal so groß ist wie die des Standards.

4.2.14 In-Gel Verdau mit der weniger spezifischen Protease Elastase

In einem weiteren Versuch wird ein anderes Enzym zum Verdau des Proteins verwendet, um die Anwendbarkeit durch verschiedene Proteasen zu testen. Das mit Trypsin nur schwer untersuchbare Protein BR wird als Standard verwendet, da im Lösungsverdau gute Ergebnisse erzielt wurden. 1 pmol BR werden wie in Abschnitt 3.7 dargestellt mit Elastase verdaut. Auch hier zeigt sich, dass nach PMF-Suche für die gemischten Gele eine höhere Anzahl an Peptiden identifiziert werden kann (Abb. 4.29).

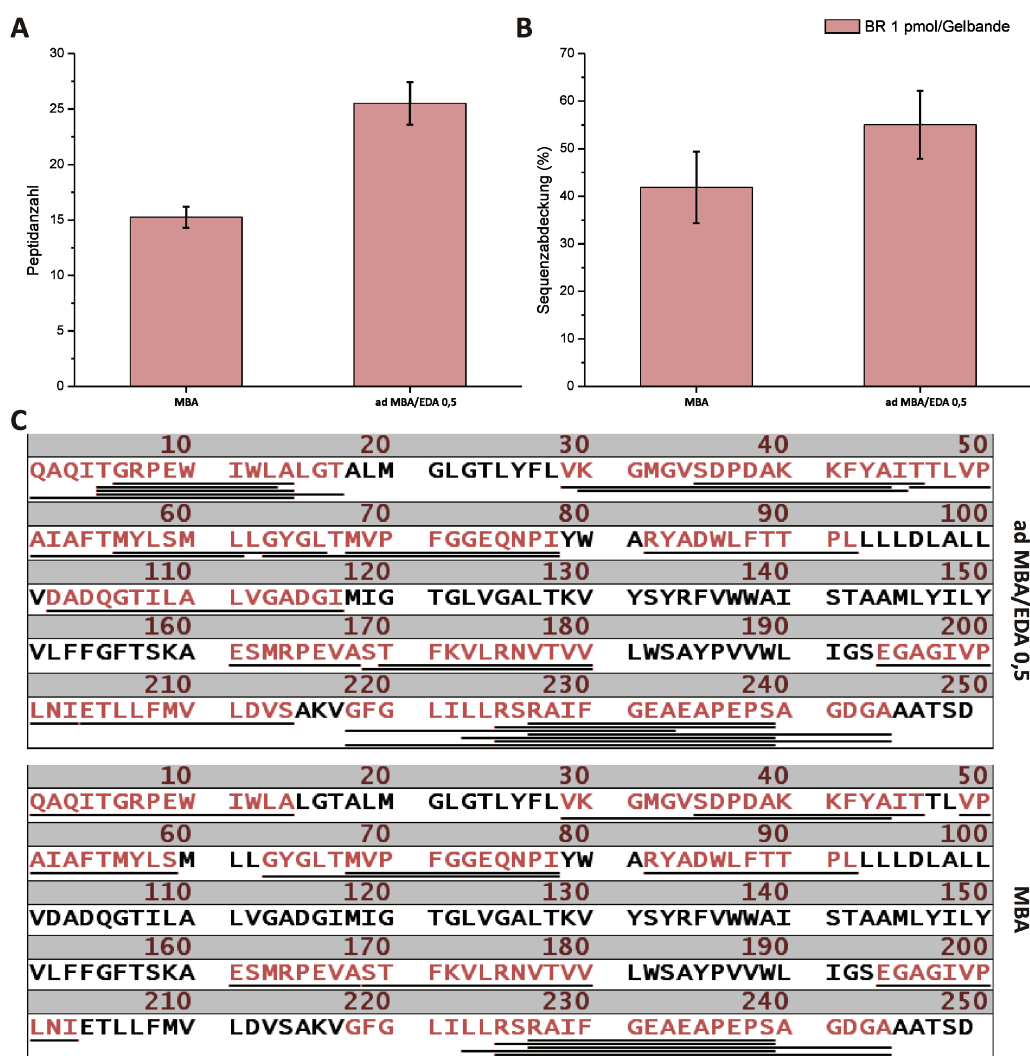


Abb. 4.29 Elastaseverdau in Standard- und adaptiertem MBA/EDA-Gel

Gelparameter: MBA: 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5; (A) Peptidanzahl (B) Sequenzabdeckung (C) Sequenzabdeckung durch Darstellung der identifizierten Peptide; 1 pmol/Gelbande BR (n=4)

Die Anzahl der identifizierten Peptide erhöht sich circa um 60% (Peptidliste siehe Tab. 9.6). Sämtliche hohen Signale der Spektren sind dem BR-Protein zuzuordnen und keine Autoproteolysesignale des verwendeten Enzyms. Die Sequenzabdeckung steigt bei Verwendung des MBA/EDA-Systems von 40% auf 55% (Abb. 4.29A,B). Abbildung 4.29 C zeigt die für Elastase typische Clusterbildung in bestimmten Sequenzbereichen. Vor allem im N-terminalen Bereich des Proteins kann beim Mischgel ein Zuwachs der Peptidzahl detektiert werden. Anhand der PMF-Spektren ist eine Erhöhung der Signalintensitäten – wie auch schon in den tryptischen Verdauspektren – um den Faktor 3 zu belegen (Abb. 4.30). Ebenfalls sind durch die vergrößerten Bereiche im Spektrum des adaptierten neuen Gelsystems zusätzlich zugeordnete Peptide verdeutlicht.

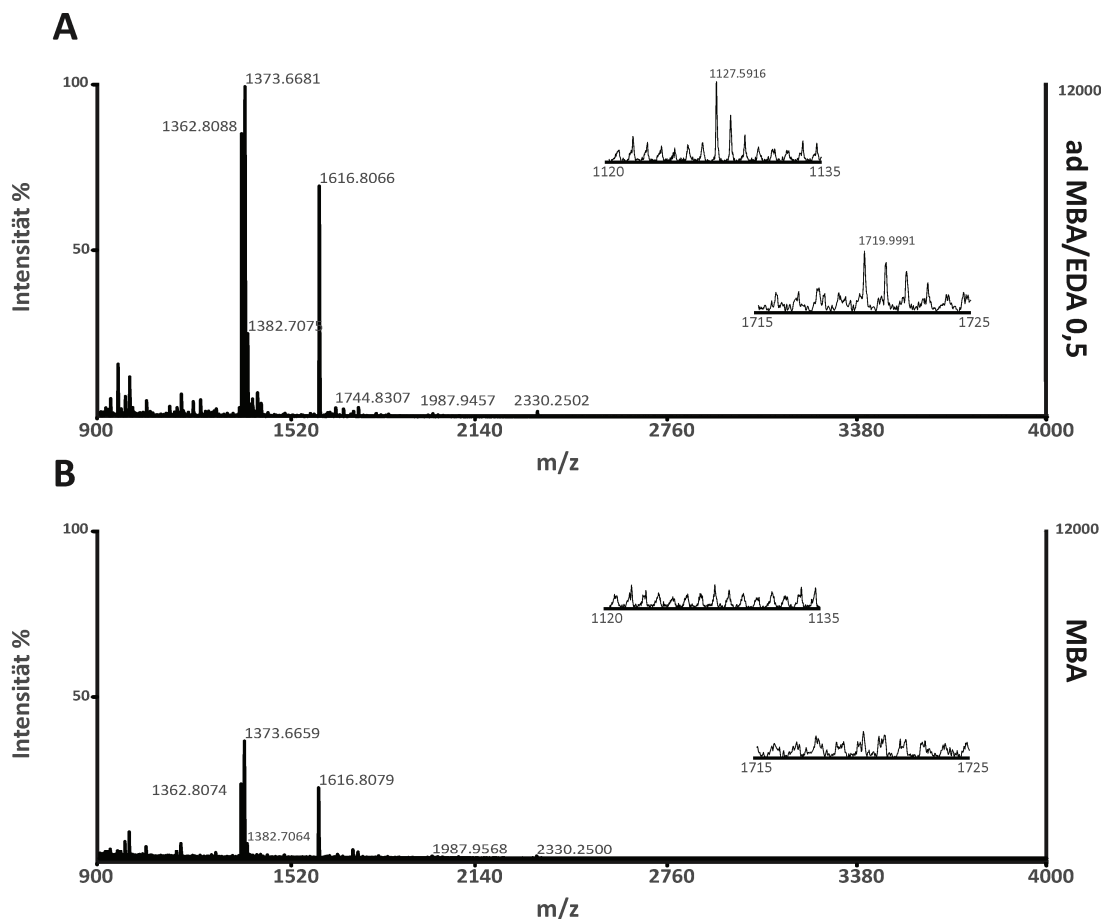


Abb. 4.30 BR-Spektren von Standard- und adaptiertem MBA/EDA-Gel

Tris-Glycin: Gelparameter: MBA 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5.
Proteinmenge: 1 pmol/Gelbande

4.2.15 Verdau mit der weniger spezifischen Protease Pepsin

Das Enzym Pepsin wird hauptsächlich bei Lösungsverdau für Experimente verwendet, die ein saures Milieu erfordern (z.B. beim Austausch von Wasserstoff durch Deuterium). Anhand der Datenanalyse eines nanoHPLC-aufgetrennten Lösungsverdau von Purpurmembranen können Aussagen über die Spezifität des Enzyms getroffen werden, die für die gelbasierte PMF-Analyse nützlich sind (Abb. 4.31).

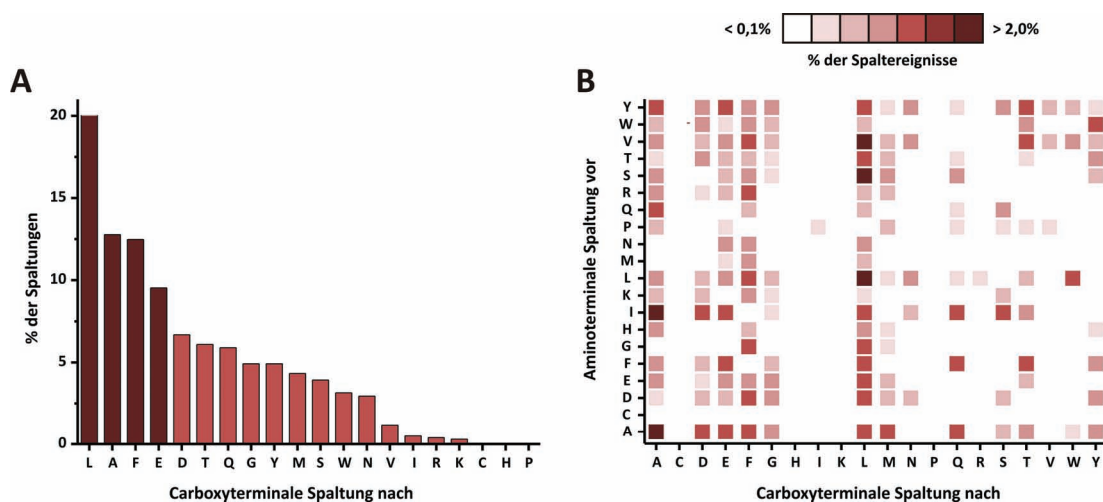


Abb. 4.31 Schnittspezifität von Pepsin

(A) Absolute carboxyterminale Spezifität (B) 2D-Spezifitätsplot zur Veranschaulichung der Schnittfrequenz zwischen zwei definierten Aminosäuren

Noch sind keine erfolgreichen in-Gel-Verdau mit Hilfe von Pepsin bekannt. Aus diesem Grund wird ein in-Gel Verdau des Proteins Amylase aus einem Standardgel (T%= 14%, C%= 2,6%), einem gemischten Gel (MBA/EDA 0,5) und einem adaptierten MBA/EDA-Gel (0,5) durchgeführt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse zeigt, dass jedoch max. vier Peptide per MS/MS-Experiment verifiziert und eindeutig dem Protein Amylase zugeordnet werden können. Das MS/MS-Spektrum des Peptids 1302,64 Da ist als Beispiel aufgeführt und belegt das schlechtere Fragmentierungsverhalten von nicht-tryptischen Peptiden (Abb. 4.32).

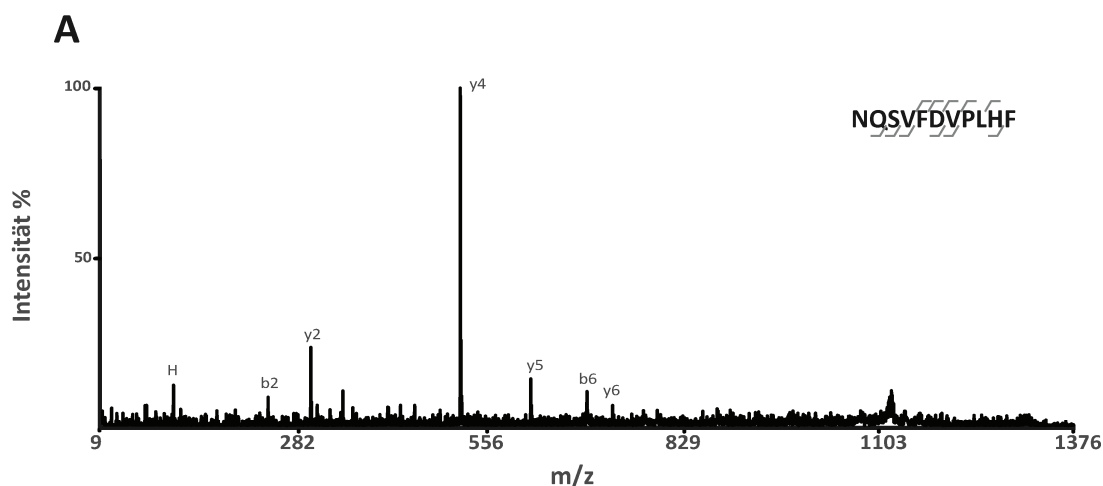


Abb. 4.32 Fragmentspektrum eines durch Pepsin entstandenen Amylase-Peptids

MS/MS des Peptids 1302,64 Da; 1 pmol Protein pro Gelbande; graue Markierungen in der Sequenz geben nachgewiesene b- und y-Ionen an

Nach interner Nachkalibrierung auf die durch MS/MS verifizierten Amylase-Signale und einen dem Pepsin zugeordneten *Peak*, wird eine PMF-Suche mit 10 ppm Massengenauigkeit durchgeführt. Die Daten sind in Abb. 4.33 dargestellt.

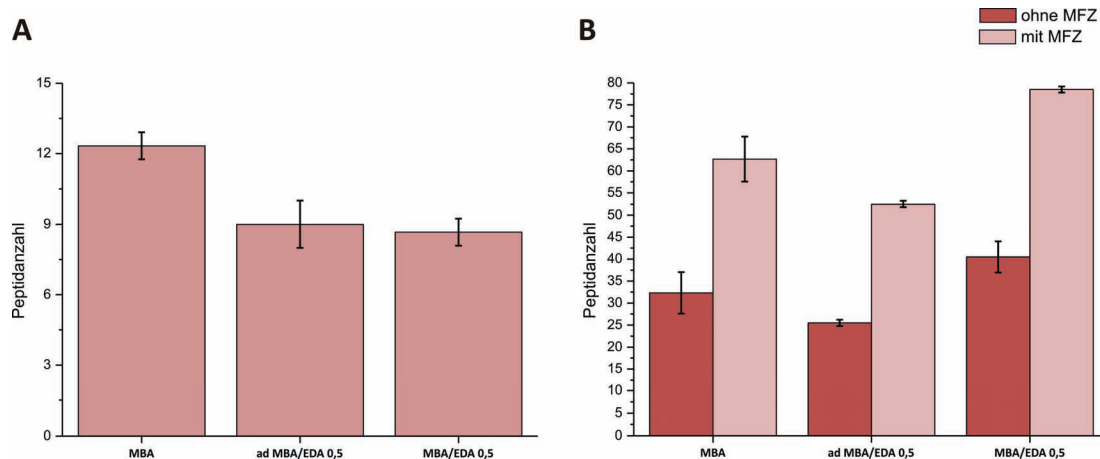


Abb. 4.33 Auswertung der peptischen Proteolyse von Amylase

(A) identifizierte Peptide in den unterschiedlichen Gelsystemen mit Enzymspezifität FLEA; (B) identifizierte Peptide in den unterschiedlichen Gelsystemen ohne Enzymspezifität ohne und unter Berücksichtigung von Mehrfachzuordnungen (MFZ); 1 pmol Protein pro Gelbande

Im normalen Standardgel können mit der Enzymspezifität FLEA circa 25% mehr peptische Peptide zugeordnet werden als bei den anderen Gelsystemen (Abb. 4.33A). Das Enzym schneidet gemäß der nanoLC-Daten zu 55% nach den Aminosäuren Leucin, Alanin, Phenylalanin und Glutaminsäure (Abb. 4.31). Wird zusätzlich das reale Vorkommen dieser Aminosäuren in den Proteinsequenzen berücksichtigt, sinkt dieser Wert sogar auf ca. 40%. Da ein solches Maß an Spezifität eigentlich unzureichend für die Verwendung in PMF-Suchen ist, wird zusätzlich noch ohne Spezifität gesucht. In diesem Fall kann für das Gelsystem mit gemischten *Crosslinkern* ohne Adaption die höchste Anzahl an Peptiden identifiziert werden, deren Anzahl 25% über der des Standards liegt (Abb. 4.33B). Werden überlappende Peptide in die Daten miteinbezogen, zeigt sich, dass auch in diesem Fall der Zuwachs 25% beträgt. Die Daten der adaptierten Gele sind in beiden Fällen circa 20% schlechter als die des Standards. Abbildung 4.34 stellt die abgedeckte Sequenz des Proteins am Beispiel des nicht adaptierten MBA/EDA-Gelsystems dar. Mit der Enzymspezifität FLEA (A) werden nur wenige Bereiche abgedeckt, bei der Suche ohne Spezifität werden mehr Peptide zugeordnet (B). Wie bei Elastase zeichnen sich viele Bereiche durch eine Clusterbildung aus. Werden überlappende Peptide zugelassen, also solche, die einen gleichen m/z-Wert haben, bestätigt sich dieser Eindruck noch (C).

A	10	20	30	40	50	60	70
	VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAVWI	PPAYKGLSQS	DNGYGPYDLY	DLGEFQQKGT
	80	90	100	110	120	130	140
	VRTKYGTKSE	LQDAIGSLHS	RNVQVYGDVV	LNHKAGADAT	EDVTAVEVNP	ANRNQETSEE	YQIKAWTDFR
	150	160	170	180	190	200	210
	FPGRGNTYS	FKWHWHYFDG	ADWDESRKIS	RIFKFRGEGK	AWDWEVSSN	GNVDYLMYAD	VDYDHPDVVA
	220	230	240	250	260	270	280
	ETKKWGIWYA	NELSLDGFRT	DAAKHIKFSF	LRDWVQAVRQ	ATGKEMFTVA	EYWQNNAGKL	ENYLNKTSFN
	290	300	310	320	330	340	350
	QSVFDVPLHF	NLQAASSQGG	GYDMRRLLDG	TVVSRHPEKA	VTFVENHDTQ	PGQSLESTVQ	TWFKPLAYAF
B	360	370	380	390	400	410	420
	ILTRESGYPQ	VFYGDMYGTK	GTSPKEIPSL	KDNIEPILKA	RKEYAYGPQH	DYIDHPDVIG	WTREGDSSAA
	430	440	450	460	470	480	490
	KSGLAALITD	GPGGSKRMYA	GLKNAGETWY	DITGNRSDTV	KIGSDGWGEF	HVNDGSVSIY	VQK
	10	20	30	40	50	60	70
	VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAVWI	PPAYKGLSQS	DNGYGPYDLY	DLGEFQQKGT
	80	90	100	110	120	130	140
	VRTKYGTKSE	LQDAIGSLHS	RNVQVYGDVV	LNHKAGADAT	EDVTAVEVNP	ANRNQETSEE	YQIKAWTDFR
	150	160	170	180	190	200	210
	FPGRGNTYS	FKWHWHYFDG	ADWDESRKIS	RIFKFRGEGK	AWDWEVSSN	GNVDYLMYAD	VDYDHPDVVA
C	220	230	240	250	260	270	280
	ETKKWGIWYA	NELSLDGFRT	DAAKHIKFSF	LRDWVQAVRQ	ATGKEMFTVA	EYWQNNAGKL	ENYLNKTSFN
	290	300	310	320	330	340	350
	QSVFDVPLHF	NLQAASSQGG	GYDMRRLLDG	TVVSRHPEKA	VTFVENHDTQ	PGQSLESTVQ	TWFKPLAYAF
	360	370	380	390	400	410	420
	ILTRESGYPQ	VFYGDMYGTK	GTSPKEIPSL	KDNIEPILKA	RKEYAYGPQH	DYIDHPDVIG	WTREGDSSAA
	430	440	450	460	470	480	490
	KSGLAALITD	GPGGSKRMYA	GLKNAGETWY	DITGNRSDTV	KIGSDGWGEF	HVNDGSVSIY	VQK
	10	20	30	40	50	60	70
	VNGTLMQYFE	WYTPNDGQHW	KRLQNDAEHL	SDIGITAVWI	PPAYKGLSQS	DNGYGPYDLY	DLGEFQQKGT
	80	90	100	110	120	130	140
	VRTKYGTKSE	LQDAIGSLHS	RNVQVYGDVV	LNHKAGADAT	EDVTAVEVNP	ANRNQETSEE	YQIKAWTDFR
	150	160	170	180	190	200	210
	FPGRGNTYS	FKWHWHYFDG	ADWDESRKIS	RIFKFRGEGK	AWDWEVSSN	GNVDYLMYAD	VDYDHPDVVA
	220	230	240	250	260	270	280
	ETKKWGIWYA	NELSLDGFRT	DAAKHIKFSF	LRDWVQAVRQ	ATGKEMFTVA	EYWQNNAGKL	ENYLNKTSFN
	290	300	310	320	330	340	350
	QSVFDVPLHF	NLQAASSQGG	GYDMRRLLDG	TVVSRHPEKA	VTFVENHDTQ	PGQSLESTVQ	TWFKPLAYAF
	360	370	380	390	400	410	420
	ILTRESGYPQ	VFYGDMYGTK	GTSPKEIPSL	KDNIEPILKA	RKEYAYGPQH	DYIDHPDVIG	WTREGDSSAA
	430	440	450	460	470	480	490
	KSGLAALITD	GPGGSKRMYA	GLKNAGETWY	DITGNRSDTV	KIGSDGWGEF	HVNDGSVSIY	VQK

Abb. 4.34 Identifizierte Peptide beim MBA/EDA 0,5-Gelsystem

Pepsin Verdau von Amylase; Proteinmenge 1 pmol/Gelbande (A) identifizierte Peptide mit Enzymspezifität FLEA; identifizierte Peptide ohne Enzymspezifität (B) ohne und (C) unter Berücksichtigung von Mehrfachzuordnungen

Beim Vergleich der Amylase-Spektren aus den unterschiedlichen Gelsystemen (Abb. 4.35) fällt auf, dass das Spektrum des adaptierten Gels (B) vor allem durch fehlende Intensität und eine unruhige Basislinie heraussticht. Der vergrößerte Bereich verdeutlicht die unterschiedlichen S/N-Werte der Peptide.

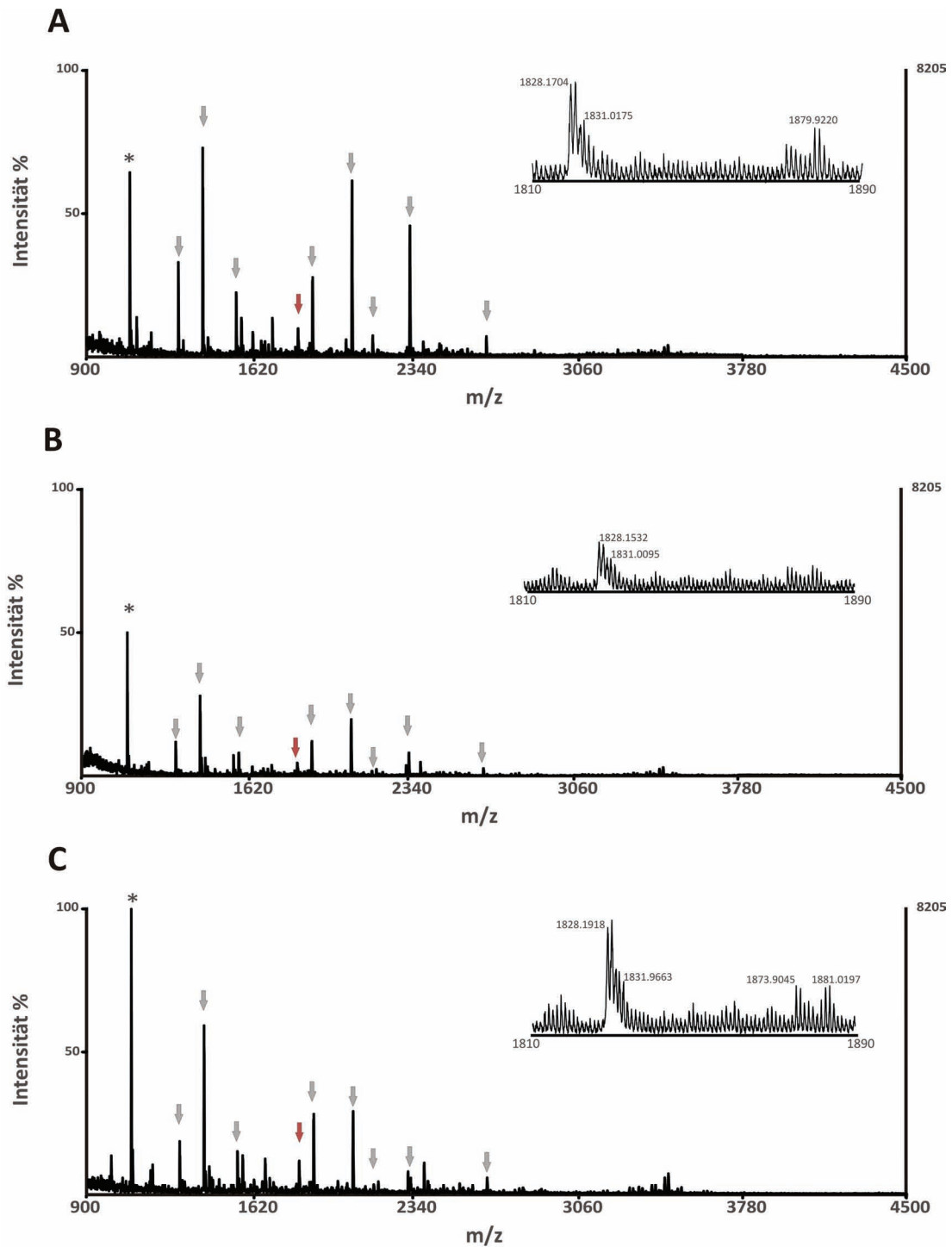


Abb. 4.35 Durch Pepsin generierte Amylase-Spektren der unterschiedlichen Gelsysteme

Proteinmenge: 1 pmol/Gelbande; graue Pfeile – ausgewählte Amylase-Peptide, * - Pepsin-Peptid

rote Pfeile – vergrößerter Massenbereich; (A) MBA 14% T/2,6% C; (B) adaptiert 15,34% T/3,85% C
MBA/EDA 0,5; (C) 14% T/2,6% C MBA/EDA 0,5

4.2.16 Western Blot

Die biologische Fragestellung erfordert zum Teil orthogonale Detektionsverfahren wie z.B. die Antikörperfärbung, die nur bestimmte Aspekte des zu untersuchenden Systems visualisiert. Da sich viele dieser Nachweismethoden nicht direkt in Gelen durchführen lassen, werden die Proteine via Western Blot elektrophoretisch auf Membrane aus z.B. Polyvinylidenfluorid oder Nitrocellulose transferiert, um eine bessere Zugänglichkeit der Reagenzien zu gewährleisten. Für diese Methode werden jedoch Puffer verwendet, deren pH-Werte im leicht alkalischen Bereich (pH 10,4) liegen und somit eine Esterspaltung von EDA hervorrufen könnte. Um die Kompatibilität der gemischten Gele mit diesen Puffern zu überprüfen, werden eine ENL-Probe und ein Zelllysats per Standardgel (T= 14%, C= 2,6%), adaptiertem MBA/EDA 0,5-Gel und purem EDA-Gel getrennt und *semidry* auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Danach werden die Gele einer CBB-Färbung unterzogen, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Der Nachweis von ENL wird durch polyklonale α -ENL und α -Kaninchen-HRP Antikörper geführt (siehe Abschnitt 3.6).

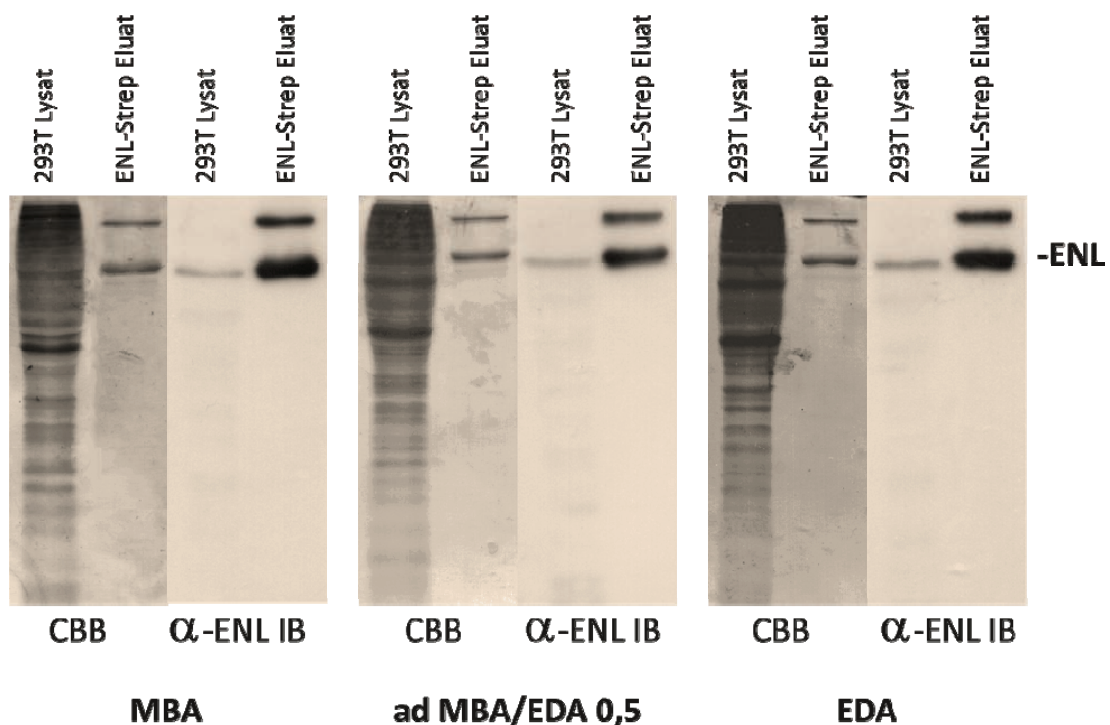


Abb. 4.36 Immunblot eines 293T-Lysats und eines ENL-Strep-Fusionproteins

Linke Spalte: CBB-gefärbtes Gel; rechte Spalte: α -ENL IB - polyklonaler α -ENL Immunblot

Das Gel aus gemischten *Crosslinkern* und auch das pure EDA-Gel lassen, obwohl sie Puffer mit basischen pH-Werten exponiert werden, keine Anzeichen einer Deformation oder gar einer Auflösung erkennen. Das Immunblotting zeigt in allen drei Fällen das gleiche Resultat und ist somit mit allen getesteten Gelsystemen möglich. Auch der Transfer von Gel zu Membran scheint gleichwertig zu sein.

4.2.17 RuBPS-Färbung

Die kolloidale CBB-Färbung hat wie schon erwähnt ein Detektionslimit, das an das der Silberfärbung nicht heranreicht. Die Visualisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS hat hingegen eine vergleichbare Sensitivität, findet in saurem Milieu statt und sollte daher mit dem Quervernetzer EDA kompatibel sein. In Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass dies für die Färbung an sich der Fall ist. Nun soll überprüft werden, ob eventuell mehr Peptide per PMF als mit der Standardfärbung zu detektieren sind. In den meisten Fällen sind die erhaltenen Spektren jedoch so unsauber, dass kein Protein signifikant nachgewiesen werden kann. Für folgende Gelbanden ist eine Auswertung möglich:

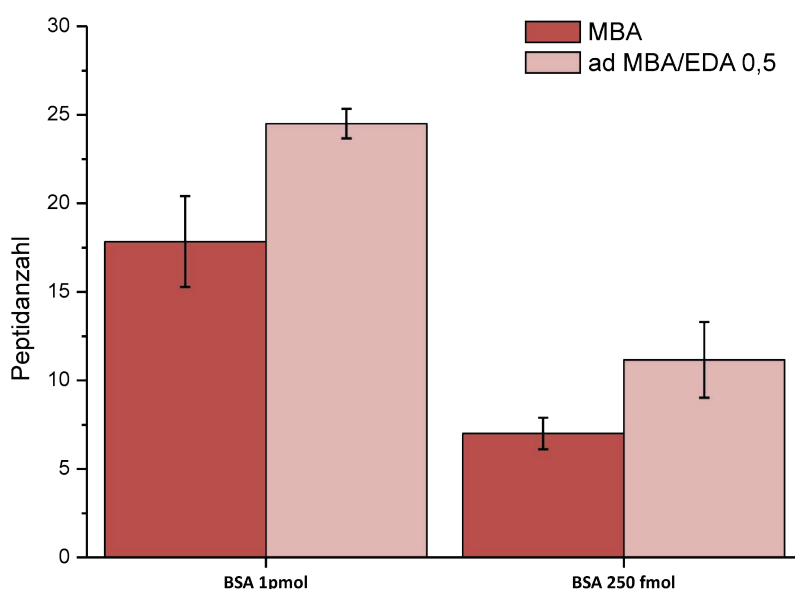


Abb. 4.37 PMF-Vergleich von RuBPS-gefärbten Standard- und Mischgelen

Angegebene Proteinmenge gilt pro Gelbande (n=4)

Abb. 4.37 zeigt, dass die Anzahl der identifizierten BSA-Peptide für die gemischten Gele signifikant besser ist als für die Standardgele. Im Verhältnis sind die Ergebnisse jedoch wesentlich schlechter als die, die bei einer Färbung mit kolloidalem CBB erhalten werden. Wie oben schon erwähnt sind die gemessenen MS-Daten qualitativ schlechter als die der mit kolloidalem CBB gefärbten Gele, was auf eine mangelnde Kompatibilität der Färbung mit MS schließen lässt.

4.2.18 MS- und MS/MS-Ergebnisse nach IEF/SDS-PAGE mit adaptierten MBA/EDA-Gelen in der zweiten Dimension

Die 2D-Gelelektrophorese ist immer noch ein Mittel der Wahl, wenn komplexe Proteinmischungen zu trennen sind. Aus diesem Grund ist die Kompatibilität der gemischten Crosslinkergele mit vorausgehender IEF ein wichtiger Punkt für ihre Anwendbarkeit bei proteom-analytischen Fragen. Eine komplexe Probe, das cytosolische Extrakt von *C. glutamicum*, wird mittels TCA-Fällung aufgereinigt, um vorhandene Salze zu entfernen (siehe Kapitel 3.2.2). Wie Abb. 4.38 verdeutlicht, hat diese Prozedur jedoch auch einen Proteinverlust zur Folge.

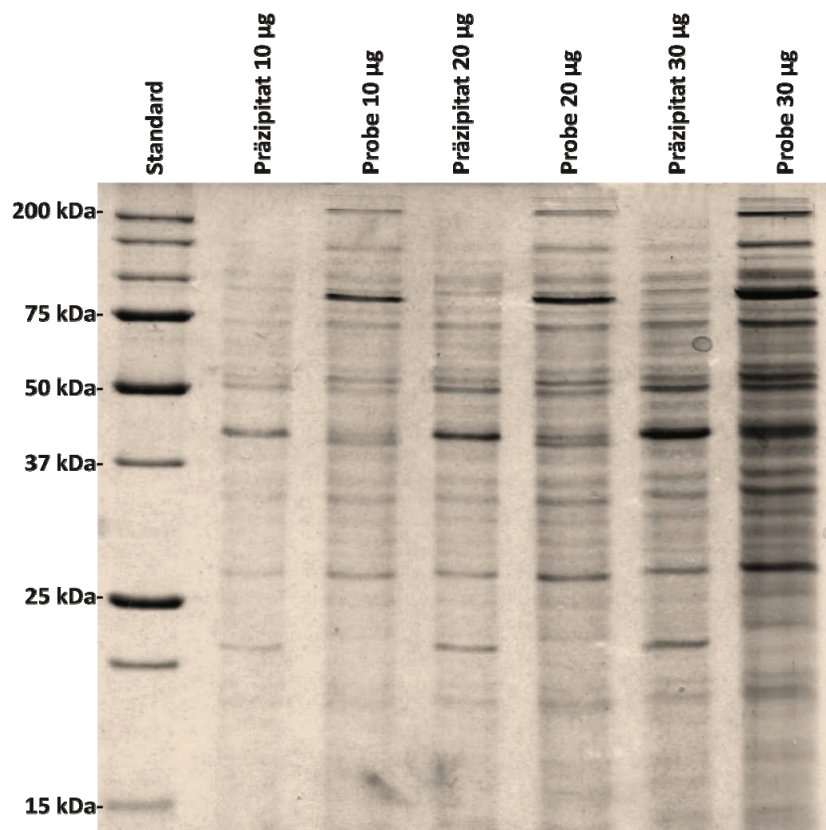


Abb. 4.38 Vergleich zwischen Probe und deren Präzipitat in verschiedenen Konzentrationen
cytosolische *C. glutamicum*-Probe, unaufgereinigt und nach TCA-Fällung; angefärbt mit kolloidalem CBB

Die Probe wird in erster Dimension durch IEF getrennt. Als zweite Dimension werden ein Standardgel (T= 14%, C= 2,6%) oder ein adaptiertes Mischgel (T= 15,3%, C= 3,9%, MBA/EDA 0,5) verwendet

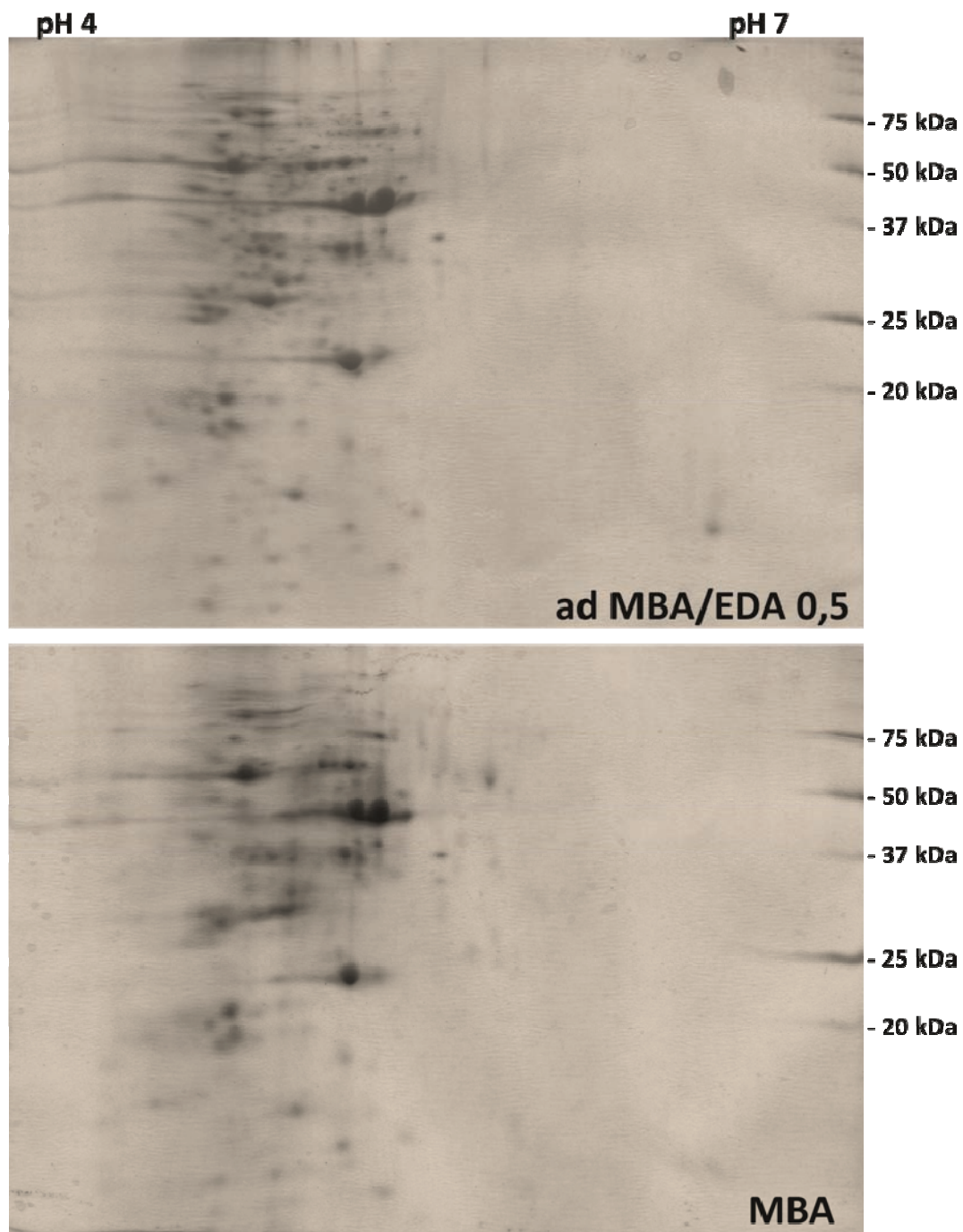


Abb. 4.39 2D-Gel einer cytosolischen *C. glutamicum*-Probe

MBA: 14% T/2,6% C; adaptiert 15,34% T/3,85% C MBA/EDA 0,5; Proteinmenge vor Fällung: 200µg; kolloidale CBB-Färbung

Das Auflösungsmuster der Proteinspots auf dem MBA/EDA-Mischgel gleicht dem des Standardgels. Insgesamt scheinen die Spots jedoch ein wenig besser fokussiert und aufgelöst zu sein. Weder im Standard- noch im gemischten Gel wird ein starkes Schmieren der Probe durch Salzverunreinigungen oder ein stark unterschiedliches Laufverhalten beobachtet. Auch wird in keinem der beiden Geltypen ein Proteinspot exklusiv wahrgenommen.

32 ausgewählte Proteine, die sowohl in MBA/EDA- als auch in Standardgelen gut zu erkennen sind, werden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-MS/MS analysiert.

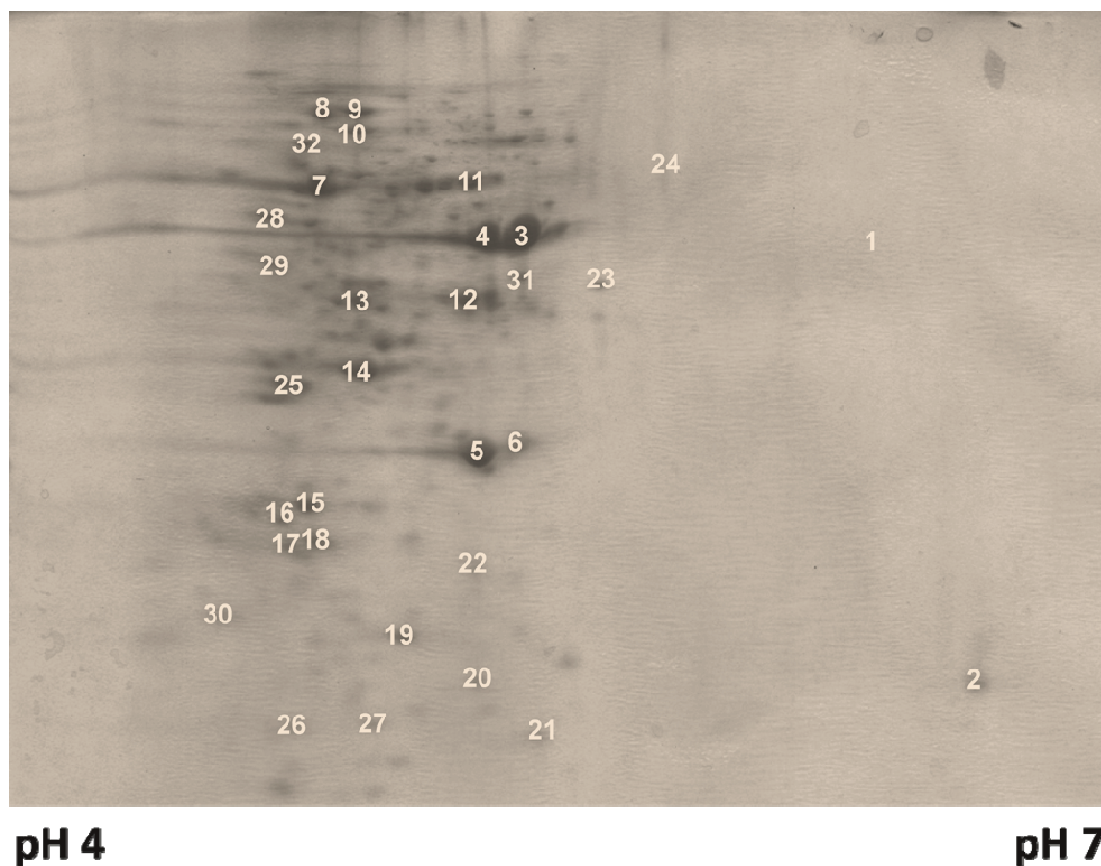


Abb. 4.40 Analysierte Proteinspots der cytosolischen *C. glutamicum*-Probe

weiße Zahlen markieren den ausgeschnitten Bereich im Gel

Tab. 4.12 Aus 32 Gelspots identifizierte Proteine der cytosolischen *C. glutamicum* Probe

Acc. No. – Nummer des Datenbankeintrags, Mr – molare Masse, pI – isoelektrischer Punkt

Spot	Proteine	Acc.No	Mr	pI
1	-			
2	-			
3	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	Cg1791	36194	5,16
4	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	Cg1791	36194	5,16
	Uncharacterised P-loop ATPase protein	Cg1794	34710	6,01
5	Manganese superoxide dismutase	Cg3237	22088	5,14
6	Manganese superoxide dismutase	Cg3237	22088	5,14
7	6-Phosphogluconate dehydrogenase	Cg1643	52579	4,69
	Enolase	Cg1111	44978	4,65
8	Isocitrate dehydrogenase	Cg0766	80146	4,72
	Probable Peptidyl-Dipeptidase A protein	Cg2527	73880	4,70
9	Transketolase	Cg1774	75220	4,80
	2-Isopropylmalate synthase	Cg0303	68430	4,79
10	2-Isopropylmalate synthase	Cg0303	68430	4,79
11	Butyryl-CoA:acetate coenzyme A transferase	Cg2840	54540	5,06
12	Fructose-bisphosphate aldolase	Cg3068	37362	5,04
	L-Lactate dehydrogenase	Cg3219	34498	5,10
13	O-Acetylserine (Thiol)-Lyase	Cg2833	32768	4,80
	Malate dehydrogenase oxidoreductase protein	Cg2613	34887	4,79
14	Triosephosphate isomerase	Cg1789	27357	4,80
	Predicted hydrolases of the HAD superfamily	Cg2902	29633	4,80
15	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	Cg0048	18486	4,70
16	Putative signal transduction protein, FHA domain	Cg1630	15393	4,76
17	Starvation-induced DNA protecting protein	Cg3327	18344	4,69
18	conserved hypothetical protein	Cg1322	19283	4,70
	Adenylate kinase	Cg0648	19415	4,66
19	Nucleoside diphosphate kinase	Cg2603	14791	4,97
20	Putative signal transduction protein, FHA domain	Cg1630	15393	4,76
21	hypothetical protein predicted by Glimmer	Cg2025	11257	5,28
22	possible Phosphopentose isomerase	Cg2658	17148	5,10
	conserved hypothetical protein	Cg0807	15168	5,11
23	-			
24	NADP-specific glutamate dehydrogenase	Cg2280	49357	5,57
25	related to aldose 1-epimerase	Cg2558	27609	4,59
	Heat shock protein hsp70	Cg3100	66247	4,55
26	Chaperonin 10 Kd subunit	Cg0690	10763	4,67
27	Thioredoxin	Cg3423	11932	4,84
28	Phosphoglycerate kinase	Cg1790	42785	4,55
29	Ketol-acid Reductoisomerase	Cg1437	36250	4,55
30	Ferritin-like protein	Cg2782	18055	4,42
31	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	Cg1791	36194	5,16
	probable ATP-dependent protease	Cg3079	93174	5,00
32	Heat shock protein hsp70	Cg3100	66247	4,55

Über PMF-Suche werden in beiden Geltypen in 29 von 32 ausgeschnittenen Spots Proteine identifiziert. Die isoelektrischen Punkte der zugeordneten Proteine korrelieren gut mit der pH-Region des zweidimensionalen Gels. Auch die Auftrennung nach der molaren Masse stimmt mit Ausnahmen, wie zum Beispiel Spot 31 (Cg3079), mit den mittels Längenstandard abgeschätzten Größen überein.

Tab. 4.13 PMF-Ergebnisse der Gele im Vergleich

Peptide – Anzahl der PMF zugeordneten Peptide, SD – Standardabweichung (n=3)

Spot	Proteine	MBA		ad MBA/EDA 0,5	
		Peptide	SD	Peptide	SD
1	-				
2	-				
3	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	19,0	1,0	21,0	2,6
4	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	20,7	0,6	18,3	2,3
	Uncharacterised P-loop ATPase protein			8,3	1,2
5	Manganese superoxide dismutase	10,0	0	10,0	0
6	Manganese superoxide dismutase	9,7	0,6	9,3	1,2
7	6-Phosphogluconate dehydrogenase	18,5	0,7	19,3	1,5
	Enolase	20,0	1,0	20,5	0,7
8	Isocitrate dehydrogenase	45,3	2,1	44,3	3,8
	Probable Peptidyl-Dipeptidase A protein	22,0	2,8	20,0	0
2,1	Transketolase	32,7		31,7	5,5
2,5	2-Isopropylmalate synthase	25,3		25,5	0,7
10	2-Isopropylmalate synthase	45,3	0,6	44,0	5,3
11	Butyryl-CoA:acetate coenzyme A transferase	35,3	2,3	33,3	0,6
12	Fructose-bisphosphate aldolase	28,3	0,6	28,0	1,0
	L-Lactate dehydrogenase			16,0	2,6
13	O-Acetylserine (Thiol)-Lyase	22,7	2,1	25,7	0,6
	Malate dehydrogenase oxidoreductase protein	15,3	0,6	15,7	0,6
14	Triosephosphate isomerase	18,7	0,6	16,7	1,5
	Predicted hydrolases of the HAD superfamily	12,0	0	13,5	2,1
15	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	10,3	0,6	10,3	0,6
16	Putative signal transduction protein, FHA domain	10,7	0,6	10,7	0,6
17	Starvation-induced DNA protecting protein	8,3	1,2	7,0	1,0
18	conserved hypothetical protein	9,7	2,1	12,0	3,0
	Adenylate kinase	8,3	0,6		
19	Nucleoside diphosphate kinase	5,0	1,0	5,0	0
20	Putative signal transduction protein, FHA domain	8,3	0,6	7,7	0,6
21	hypothetical protein predicted by Glimmer	4,7	0,6	6,7	0,6
22	possible Phosphopentose isomerase	7,7	0,6	6,7	0,6
	conserved hypothetical protein			4,0	0
23	-				

Spot	Proteine	MBA		ad MBA/EDA 0,5	
		Peptide	SD	Peptide	SD
24	NADP-specific glutamate dehydrogenase	38,0	1,7	35,3	4,7
25	related to aldose 1-epimerase	10,3	1,4		
	Heat shock protein hsp70	16,3	1,2	17,0	2,6
26	Chaperonin 10 Kd subunit	6,0	0	8,3	1,2
27	Thioredoxin	8,3	1,2	8,0	1,0
28	Phosphoglycerate kinase	23,0	1,0	24,7	1,5
29	Ketol-acid Reductoisomerase	13,7	1,5	15,0	1,0
30	Ferritin-like protein	6,3	0,6	6,7	0,6
31	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	18,7	2,1	14,0	1,0
	probable ATP-dependent protease	19,0	2,8	19,0	4,4
32	Heat shock protein hsp70	33,7	6,1	30,3	4,6

Bei der Betrachtung der PMF-Daten ist im Rahmen der Standardabweichung für keines der beiden Gelsysteme ein Vorteil zu verzeichnen. Von jedem analysierten Spot sind zusätzlich die acht intensivsten *Peaks* des PMF-Spektrums fragmentiert worden, um die Resultate zu verifizieren. Alle identifizierten Peptide, die mindestens in 2 von 3 Replikaten in je beiden analysierten Gelsystemen vorkommen (insgesamt 111 Peptide), werden zur Auswertung hinzugezogen. Beim Vergleich der *MS/MS-Ion scores* schneiden die adaptierten Mischgele durchschnittlich um 7 Punkte besser ab (Tab. 9.7).

Zusätzlich wird ein vergleichbares 2D-Experiment mit IPG-Streifen durchgeführt, die ein kleineres pH-Intervall umfassen (3 bis 5,6), welches für die gegebene pI-Verteilung der Probe geeigneter sein sollte. Hierbei wird das MBA/EDA-2D-Gel vollständig ausgewertet und nicht nur 32 Spots betrachtet. Es wird jeweils nur der erste Treffer der Datenbanksuche berücksichtigt. In 176 Proben können 165 Proteine identifiziert werden. Von diesen werden 21 in mindestens zwei Proben nachgewiesen. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Tab. 9.8 und Abb. 9.1 ersichtlich.

5. Diskussion

5.1 *Aquifex aeolicus*

Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) ist der größte Enzymkomplex der Atmungskette. 24 Gene des hyperthermophilen Eubakteriums *Aquifex aeolicus* kodieren 13 nicht-homologe Komplex I-Untereinheiten [Deckert 1998], von denen einige sehr hydrophobe integrale Membranproteine sind. Mittels Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie wurde zwar bereits gezeigt, dass das Enzym eine L-förmige Struktur aufweist, hochauflösendere Strukturdaten liegen für Komplex I noch nicht vor [Clason 2010].

Mit Hilfe der in dieser Arbeit eingesetzten analytischen Strategie konnte gezeigt werden, dass die etablierte Komplex I-Aufreinigung gut ist, aber für eine Kristallstrukturanalyse des Enzyms nicht ausreicht. Über die gelbasierte Trennung der Präparation, tryptische Proteolyse und anschließende massenspektrometrische Messung konnten mehrere Proteine identifiziert werden, die nicht zum Komplex I gehören. Neben diversen nicht charakterisierten Proteinen, konnten von 9 genetisch annotierten Untereinheiten der ATP-Synthase (Komplex V) 5 Proteine bereits per PMF-Ansatz eindeutig nachgewiesen werden. Es konnte bestätigt werden, dass neben den genetisch möglichen 13 nicht-homologen Untereinheiten auch zahlreiche Isoformen vorliegen. 20 der 24 Isoformen konnten massenspektrometrisch signifikant in der Enzympräparation identifiziert werden (siehe Tab. 4.3). Sogar kleine hydrophobe Untereinheiten wie Nuo A2 wurden per MS/MS-Experiment signifikant zugeordnet. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass es sich bei den Proteinsequenzen der 24 Isoformen nur um genombasierte Annotationen handelt. Möglicherweise werden einige dieser annotierten Genomsequenzen auch nicht in reale Proteine translatiert. Falls die vier fehlenden Proteine (Nuo H3, J2, K2 und N1) doch präsent waren, könnte durch folgende Gründe keine Identifizierung möglich gewesen sein:

Nuo H3 und K2 sind ca. 10-11 kDa große Proteine, welche drei Transmembranhelices aufweisen. Im aufgenommen Massenbereich werden *in silico* lediglich drei tryptische Peptide ohne überlesene Schnittstelle für Nuo H3 generiert, von denen zwei einen GRAVY-Score größer 1 besitzen, da sie aus helicalen Abschnitten stammen. Für Nuo K2

werden dementsprechend nur zwei Peptide gebildet, so dass der MS-basierte Nachweis nicht möglich ist. Die Untereinheit Nuo J2 zeichnet sich durch ähnliche Parameter aus. Aus dem aus 5 Transmembranhelices bestehenden 20 kDa großen Protein werden lediglich sechs tryptische Peptide ohne überlesene Schnittstellen generiert, von denen zwei aus Helices stammen und eines eher klein ist. Im Gegensatz zu den vorher erwähnten Isoformen hat Nuo N1 eine große molekulare Masse (54 kDa), weist aber ebenfalls eine im Verhältnis zur Proteingröße beträchtliche Anzahl von 12 Transmembranhelices auf. Durch theoretische Trypsinproteolyse werden 22 Spaltprodukte erhalten, von denen nur drei Peptide einen negativen GRAVY-Score besitzen. Diese drei Peptide können durch MALDI nicht gut ionisiert werden, da es sich um zwei K-Peptide und eines mit einem Alanin-Ende (carboxyterminales Ende des Proteins) handelt [Krause 1999; Jaskolla 2008].

Bei Betrachtung der Isoform Nuo L3 fällt auf, dass deren Sequenz stark homolog zu Nuo L1 (88%) ist. So kann das MS/MS-Spektrum der Sequenz EGFLVFHGR beiden Isoformen zugeordnet werden. Da die signifikante Identifizierung von Nuo L3 allein auf diesem Peptid beruht, also ein sogenanntes *One-Hit-Wonder* darstellt, kann die Existenz dieser Isoform nicht eindeutig bestätigt werden. Insgesamt muss die starke Homologie der Isoformen der einzelnen Untereinheiten erwähnt werden, so ähneln sich Nuo D1 und D2 zu 57%. Durch ihre hydrophilen Eigenschaften ist es jedoch möglich, mehr tryptische Peptide zu generieren und hierdurch auch mehr sequenzspezifische MS/MS-Spektren zu erhalten. Dies schlägt sich im eindeutigen Nachweis beider Proteine nieder. Nuo A1 und A2 haben ebenfalls sehr homologe Sequenzabschnitte. Während Nuo A1 über ein MS/MS-Spektrum eines Peptids, das aus einer Schleifenregion stammt, nachgewiesen wurde, konnte Nuo A2 über drei MS/MS-Messungen identifiziert werden. Die Sequenzen dieser drei Peptide unterscheiden sich nur durch die zusätzliche Anwesenheit von KR bzw. R durch eine bzw. zwei überlesene Schnittstellen. Ihr Sequenzbereich liegt ebenfalls in einer hydrophilen Schleifenregion. In diesem Fall sind die basischen Aminosäuren so gelegen, dass gut messbare Peptide erzeugt werden.

Für die Untersuchung hydrophiler Untereinheiten wie Nuo G, F oder D ist Trypsin die ideale Protease, da sie viele Arginine bzw. Lysine als potentielle Schnittstellen aufweisen. Mit der tryptischen Spezifität ist es möglich, dass diese Proteine auch schon per PMF ohne MS/MS-Messung eindeutig identifiziert werden (Tab. 4.2). Auch bei den gefundenen Untereinheiten der ATP-Synthase handelt es sich um die hydrophilen Proteine des Komplexes wie z. B. die α - und β -Untereinheit. Zum Nachweis α -helikaler

Membranproteine ist Trypsin nicht so gut geeignet. Bei hydrophilen Proteinen kann statistisch nach jeder 10-12 Aminosäure geschnitten werden, so dass Peptide mit einer Molmasse im optimalen Messbereich generiert werden. Membranproteine besitzen dagegen überwiegend hydrophobe Aminosäuresequenzen. Arginin- und Lysinreste treten nur vereinzelt in den Schleifenregionen auf, so dass dem Enzym keine Möglichkeit zur Proteolyse gegeben wird. Folglich werden viele große hydrophobe Peptide generiert, die schlecht ionisierbar und schwer in Lösung zu halten sind. Möglicherweise liegen sie auch außerhalb des optimalen Massenbereichs, was auch das Problem der kleinen Peptide darstellt, die vermehrt aus den hydrophilen Schleifenregionen entstehen. Dies wird durch die erhaltenen MS/MS-Ergebnisse bestätigt. Von den verifizierten Peptiden ist nur eines vollständig (Nuo N2) und eines teilweise (Nuo L2) aus einer Transmembranhelix. Ein ernüchterndes Ergebnis. Ein weiteres Experiment mit dem Einsatz einer weniger spezifischen Protease wie Elastase oder Chymotrypsin wäre in diesem Fall evtl. von Vorteil gewesen, da die beiden Enzyme hydrophobe Aminosäuren schneiden und somit eine bessere Zugänglichkeit zu den Transmembranbereichen gewährleisten. Zwar sind für PMF-Suchen mit weniger spezifischen Enzymen sehr gute Massengenauigkeiten erforderlich, doch auch hier hätten – wie im Fall des verwendeten Trypsins – MS/MS-Experimente die Identifizierungsmöglichkeiten erhöht.

Zu der vorgeschalteten gelbasierten Trennung lässt sich sagen, dass es evtl. bessere Methoden zur Separierung der einzelnen Untereinheiten gibt. Die Trennung erfolgt lediglich eindimensional über SDS-PAGE. Obwohl die Gelspur gleichmäßig in kleine Banden geschnitten wurde, um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen, sind in den einzelnen Streifen mehrere Proteine signifikant identifiziert worden (Tab. 4.2, Nr. 24/25). Dies könnte zum Einen an einer Überladung des Gels liegen. Geht man davon aus, dass alle Isoformen in gleichen Verhältnissen vorliegen, der Komplex somit ein Molekulargewicht von ca. 1 MDa hat und wenn man die Verunreinigungen vernachlässigt, ist im Experiment eine Proteinmenge von je 15 pmol eingesetzt worden. Diese große Menge kann zu einer schlechten Auflösung durch Überladung geführt haben. Hierfür spricht ebenfalls das „Schmieren“ einiger Proteine über einen größeren Massenbereich im Gel wie z.B. Nuo D2 oder die γ -Kette der ATP-Synthase. Durch Verwendung einer kleineren Proteinmenge würden diese Effekte evtl. reduziert und es würde zu weniger Überlagerungen kommen. Eine weitere Möglichkeit zum Erzielen besserer Ergebnisse wäre die Änderung der eingesetzten Methode. Durch zweidimensionale Geltrennungen, die speziell auf den besseren Nachweis von Membranproteinen abgestimmt sind wie

16-BAC/SDS-PAGE oder dSDS [Hartinger 1996; Rais 2004], könnte eine höhere Auflösung für die hydrophoben Proteine erreicht werden. Auch eine komplette Modifikation der analytischen Strategie durch Trennung der Proteinpräparation über HPLC mit anschließender MS/MS-Messung wäre denkbar. Diese Methode ist auch für hydrophobe Proteine etabliert [Speers 2007]. Ein Vorteil dieser Technik wäre, dass die Proteine in Lösung proteolysiert werden können, so dass eine bessere Verdaueffizienz erreicht werden kann. Außerdem können milde Detergenzien zur Solubilisierung hydrophober Proteine und Peptide eingesetzt werden. Durch die vorgeschaltete HPLC-Trennung wäre auch ein Einsatz von weniger spezifischen Enzymen wie Elastase leichter. Diese erhöhen durch die Bildung von mehr Peptiden die Komplexität einer Probe, so dass ein Nachweis per PMF an seine Grenzen stößt. Leider waren alternative Strategien durch eine limitierte Probenmenge nicht möglich.

Im Vergleich zu den bisher veröffentlichten Daten über die Zusammensetzung des Komplexes [Guiral 2009] sind die Ergebnisse deutlich besser. Allerdings wurde der Komplex I entweder über ein BN-Gel aufgereinigt und nach erfolgter Trypsinproteolyse durch 2D-nanoLC-MS/MS vermessen oder nach BN/SDS-PAGE tryptisch verdaut und anschließend per MALDI-PMF analysiert. Durch den 2D-Gelansatz konnten 9 von 24 Isoformen signifikant bestimmt werden. Eine ausschließliche Untersuchung über PMF scheint also nicht ausreichend zu sein, da durch diesen Ansatz viel weniger Untereinheiten identifiziert werden konnten als mit der in dieser Arbeit angewandten analytischen Strategie. Durch die erste Dimension, bei der der Komplex im nativen Zustand verbleibt, können jedoch Verunreinigungen wie die ATP-Synthase, die sich in unserem Experiment als störend erwiesen, abgetrennt werden. Da die zweite Dimension bei diesem gelbasierten Versuch eine SDS-PAGE darstellt, werden auch hier mehrere Proteine pro Gelbande identifiziert. Dies zeigt, dass durch diese Art der zweidimensionalen Trennung keine bessere Auflösung als im eindimensionalen Experiment erzielt wird. Anders verhält es sich mit dem BN/2D-nanoLC-Experiment, durch das 13 von 24 Isoformen nachgewiesen wurden. Bis auf Nuo A und K konnte für jede Untereinheit zumindest eine Isoform gefunden werden. Diese Bilanz ist deutlich schlechter als die in dieser Arbeit identifizierte Anzahl an Untereinheiten. Im Prinzip sind die Ergebnisse jedoch nicht vergleichbar, da der analytische Ansatz durch Trennung und MS/MS-Messung mittels ESI-Ionenfalle sehr unterschiedlich ist. Werden die Unterschiede genauer betrachtet, scheint die dreidimensionale Trennung über BN-PAGE und anschließende 2D-nanoLC jedoch keinen Vorteil gegenüber der eindimensionalen Trennung zu besitzen. Da die MS/MS-

Experimente über eine ESI-online-Messung erfolgt sind, kann nicht wie im MALDI-offline-Ansatz nochmals gezielt nach Peptiden zur Fragmentierung gesucht werden. Bei einer Messung mittels ESI-Ionenfalle muss bei der Datenbanksuche die MS/MS-Toleranz der *Precursor*-Massengenauigkeit erhöht werden, was die eindeutige Zuordnung erschwert. Auch unterschiedliche Suchparameter sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Möglich ist aber auch, dass durch eine andere Präparation des Komplexes oder unterschiedliche Anzuchtbedingungen von *A. aeolicus* nicht alle Isoformen vorhanden waren (siehe unten).

Die hohe Anzahl an präsenten, unterschiedlichen Isoformen könnte ein Grund dafür sein, dass bis jetzt keine hinreichend stabile und reproduzierbare Enzympräparation gelungen ist, um eine Kristallstrukturanalyse durchzuführen. Im weiterführenden Experiment sollte durch Modifikation des Aufreinigungsprotokolls eine Abtrennung der hydrophilen Untereinheiten erfolgen, damit dieser Teil evtl. kristallisiert werden kann. Dies ist gelungen, da nur Nuo B, D2, E, F, G und I1 nachgewiesen wurden. Somit konnten N- und Q-Modul vom hydrophoben P-Modul [Brandt 2006] abgetrennt werden. Auffällig ist, dass weder in der hydrophilen Präparation noch in der Kontrollaufreinigung die Isoformen Nuo D1 oder I2 nachgewiesen werden konnten. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Untereinheiten der NADH:Ubiquinon-Dehydrogenase variieren kann. Dies könnte mehrere Gründe haben: da das Bakterium *A. aeolicus* kommerziell erwerblich ist, könnte der Hersteller evtl. einen anderen Stamm des Organismus verwendet haben. Ein anderer Aufbau des Komplexes könnte auch durch andere Kulturbedingungen hervorgerufen worden sein oder durch Ernten der Zellen in einer anderen Wachstumsphase. Somit wird deutlich, dass die Annahme des hochdynamischen Proteombegriffes durchaus berechtigt ist, da anhand der gefundenen Ergebnisse eine durch bestimmte Einflüsse hervorgerufene Abhängigkeit der Komplexzusammensetzung bewiesen ist.

Könnten die Ursachen dieser Dynamik genauer untersucht werden, wäre es vielleicht möglich, eine homogenere (Isoformen-ärmere) Präparation zu erhalten. Wenn einzelne Untereinheiten nur in einer Form vorliegen würden, wäre eine Kristallisationsstudien mit Sicherheit leichter durchzuführen. Mit der etablierten massenspektrometrischen Methode lässt sich nun jede Aufreinigung schnell und sicher hinsichtlich der Homogenität überprüfen.

5.2 Gele mit gemischten Quervernetzern (MBA/EDA)

5.2.1 Einleitung

Die Qualität des Massenspektrums einer in-Gel verdauten Probe wird stark durch deren Menge beeinflusst [Granvogl 2007]. Probenverluste während der Analyse werden zum Beispiel durch Adsorption von Peptiden an den Wänden der Plastikgefäße während der Vakuumkonzentration und durch unzureichende Peptidextraktion aus dem Gel im Allgemeinen hervorgerufen [Stewart 2001; Speicher 2000]. Der erste Aspekt kann durch Tausch der verwendeten Materialien (Verwendung von *low-binding*-Produkten) vermieden werden. Die Extraktion kann durch Optimierung des Protokolls beeinflusst werden. Dieses wurde schrittweise angepasst, um die Anzahl an gewonnenen Peptiden zu verbessern. Bisher wurden jedoch noch keine Änderungen am Gelsystem selbst durchgeführt. Durch den Einsatz von spaltbaren *Crosslinkern* kann die dreidimensionale Struktur zerstört und das Gel aufgelöst werden. Dies ist für einen enzymatischen in-Gel Verdau jedoch unvorteilhaft, da die vollständige Auflösung der Quervernetzung zu langen Acrylamidketten führt. Diese sind in Wasser löslich und es bildet sich eine hochviskose Flüssigkeit. Durch Acetonitrilzugabe ziehen sich die Fäden durch Dehydrierung zusammen. Doch erst bei wesentlich größerem Acetonitril-Überschuss lagern sich die Filamente zu einem Aggregat zusammen, welches sich abtrennen lässt. Zudem ist es möglich, dass Proteine an die Oberfläche der Acrylamidfäden adsorbieren und so der weiteren Untersuchung entzogen werden. Insgesamt treten zu viele Faktoren auf, die den nachfolgenden in-Gel Verdau und Identifikationsprozess der Proteine behindern würden. Bei Verwendung eines Gelsystem mit gemischten Quervernetzern, von denen einer spaltbar ist, können die Gelporen erweitert werden, so dass eine bessere Aufnahme der Protease ins Gel möglich ist und die anschließende Peptidextraktion erleichtert wird, ohne dass das Gelgerüst an sich zerstört wird.

5.2.2 Wahl eines geeigneten *Crosslinkers* und dessen Spaltung

Bei der Auswahl eines geeigneten Quervernetzers für die Herstellung von Gelen mit gemischten *Crosslinkern* sind mehrere chemische Verbindungen in Betracht gezogen worden. Die durch Redox-Prozesse spaltbaren Moleküle DHEBA und DATD haben offensichtliche Nachteile und Unverträglichkeiten für die MS-basierte Proteinanalyse. Das in der Regel für eine Malaprade-Reaktion verwendete oxidierende Reagenz Periodsäure ist ätzend und brandfördernd. Zudem wird es zu Iodsäure reduziert, die als potentiell starkes Oxidationsmittel zu elementarem Iod reduziert werden könnte und die massenspektrometrische Analyse störend beeinflussen würde. Für ein DHEBA-Gel ($40 \times 40 \times 0,2 \text{ mm}^3$) muss außerdem eine Spaltzeit von 12 h bei 50°C angenommen werden [Tas 1979]. Zusätzlich erschwert DATD die Polymerisation und somit die Ausbildung einer Gelstruktur [Gelfi 1981]. Der *Crosslinker* BAC eignet sich nicht für die Trennung von Proteinen, da er bereits durch das standardmäßig zur Denaturierung verwendete Reagenz DTT reduziert wird.

Der basenlabile Quervernetzer EDA wurde schließlich als spaltbarer *Crosslinker* gewählt, weil es keine offensichtlichen Kompatibilitätsprobleme mit dem in-Gel Verdau und der anschließenden MS-Untersuchung gibt. Eine potentielle saure Esterspaltung des EDAs ist zu vernachlässigen, da in Proteomics-Experimenten nicht die notwendigen harschen Bedingungen für eine saure Hydrolyse vorliegen. Die Säure liegt in zu geringen Konzentrationen vor und es herrschen nicht die notwendigen hohen Temperaturen. Es sind jedoch Proteinmodifikationen oder -spaltungen durch Behandlung mit starken Basen nachgewiesen worden, die die Identifikation erschweren und vor allem Quantifizierungstechniken beeinträchtigen würden [Schwass 1984; Manabe 2005]. Es ist beispielsweise bekannt, dass Peptidbindungen C-terminal von Asparagin gespalten werden können. Die Konstante erster Ordnung der Spaltung an empfänglichen Stellen ist kleiner als $0,1 \text{ h}^{-1}$ in einer 0,1 M Natronlauge. Andere Experimente wurden mit längeren Inkubationszeiten und erhöhten Temperaturen durchgeführt, so dass daraus geschlossen werden kann, dass bei pH-Wert 12 (Wert der für die Esterhydrolyse verwendeten Ammoniumhydroxidlösung) und einer maximalen Exposition von 2 Stunden keine Proteinmodifikationen zu befürchten sind.

Gele mit EDA-Anteil lassen sich genauso problemlos gießen wie solche mit MBA als Quervernetzer. Lediglich die Polymerisationsdauer sollte aufgrund geringerer Reaktivität ausgedehnt werden [Gelfi 1981]. Da die in dieser Arbeit verwendeten EDA-enthaltenden Gele immer über Nacht auspolymerisiert worden sind, sollte dieser Faktor jedoch keine Rolle spielen. Die unterschiedlichen Reaktivitäten der beteiligten *Crosslinker*-Monomere mit Acrylamid (MBA >> EDA) könnten aber zur Folge haben, dass sich die Monomerzusammensetzung und damit auch das entstehende Netzwerk im Verlauf der Polymerisation graduell ändert. So werden wahrscheinlich zuerst größere, unspaltbare MBA-reiche Poren gebildet (Abb. 5.1B) und mit fortschreitendem Verlauf EDA-enthaltende Poren angelagert (Abb. 5.1C). Die MBA-Poren vom Beginn der Reaktion haben dann ungefähr die Größe eines entsprechenden Gels ohne den EDA-Anteil. Das endgültige Gel besitzt dann keine einheitliche Porengröße.

Durch die Esterhydrolyse würde dann ein noch heterogeneres Porensystem entstehen (Abb. 5.1D). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Gele vor und nach der Spaltung wäre in diesem Zusammenhang sehr aufschlussreich.

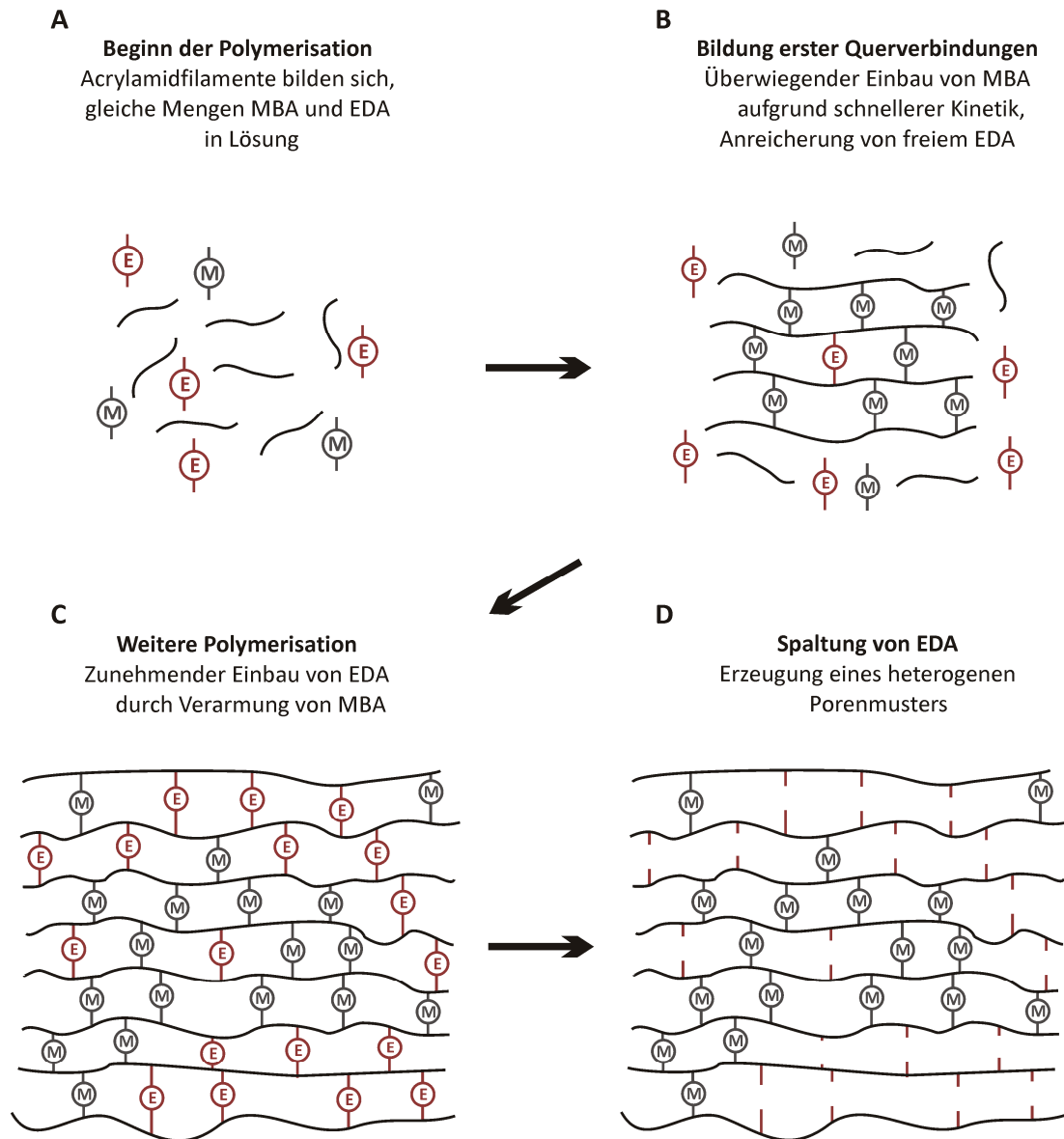


Abb. 5.1 Mögliche Porenstruktur eines MBA/EDA-Gels

Hypothese zur Generierung eines Gels mit uneinheitlicher Porengröße

Die Viskosität, Elastizität und Festigkeit eines Gels hängen vom Verhältnis der Länge der Polyacrylamidketten und der Häufigkeit ihrer Vernetzung ab. Bei langen Polyacrylamidketten sind Gele weich, elastisch und durchsichtig, bei kurzen dagegen spröde, trüb und zerbrechlich. Alle gemischten Gele sind durchsichtig. Doch je größer der EDA-Anteil ist, desto elastischer ist die Konsistenz der Gele. Dies könnte darauf hindeuten, dass neben dem oben beschriebenen Aspekt auch die unterschiedliche Crosslinkerlänge die Vernetzung und damit auch die Porosität des Gels beeinflusst. Im Gegensatz zur Sprödigkeit eines Gels, die vor allem durch große C%-Werte erhalten wird

[Righetti 1981] und zum Reißen des Gels führen kann, stört diese Eigenschaft jedoch wenig. Lediglich beim Ausschneiden einer Gelbande bzw. eines -spots mit Hilfe eines Skalpellts bereitet die Elastizität Schwierigkeiten, da das Gel widerstandsfähiger ist und die Gelstücke leichter verspringen.

MBA-Gele behalten auch in wässriger Lösung ihre durch das Gießen vorgegebene Größe bei. EDA-Gele dagegen vergrößern durch starkes Quellen (Abb. 4.6) ihre Dimensionen. Die Ausdehnung der Seitenlängen von bis zu 20% hat einen Flächenzuwachs von ca. 40% zur Folge. Dieses Verhalten hat einen Verlust an Auflösung zur Folge und dementsprechend müssen im Gegensatz zu normalen MBA-Gelen größere Gelbanden ausgeschnitten werden. Bei Gelen mit MBA/EDA ist dieses Verhalten nicht so ausgeprägt, sie verhalten sich in dieser Hinsicht entsprechend ihrer Crosslinkeranteile.

5.2.3 Kompatibilität

Während der gelelektrophoretischen Trennung wird keine ungewollte Spaltung des *Crosslinkers* beobachtet, obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass EDA für Proteinelektrophorese in Puffersystemen mit hohen pH-Werten nicht geeignet ist [Hames 1990]. Selbst während der Methodik des Immunblottens, bei der in der Regel alkalische Puffer verwendet werden, werden keine Veränderungen der Struktur und Geleigenschaften wahrgenommen. Dieser Versuch wird ebenfalls mit reinen EDA-Gelen durchgeführt. Selbst nachdem die Gele dem alkalischen Puffer für zwei Stunden ausgesetzt sind, können keine Anzeichen eines makroskopischen Zerfalls festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kann eine Zersetzung zu einer viskosen Flüssigkeit beobachtet werden, wenn die Gele für diesen Zeitraum in 5M NH_4OH inkubiert werden. Die alkalische Esterhydrolyse folgt einer Kinetik zweiter Ordnung. Folglich verlängert sich die für die komplette Hydrolyse benötigte Zeit dramatisch, wenn der pH-Wert nur im schwach basischen Bereich liegt. Somit gibt es keine Unverträglichkeit mit Tris-Glycin-, Tris-Tricin- und Immunblotsystemen.

Der einfache Austausch von MBA durch EDA resultiert in größeren Gelporen – verursacht durch die unterschiedlichen Moleküllängen – und erleichtert somit die Proteinwanderung durch das Gel. Wie in Abb. 4.7 am Vergleich von BSA und CAH zu sehen, nimmt das Trennvermögen in diesem Fall zu, während die Trennschärfe der einzelnen Banden abnimmt. Die elektrophoretische Auflösung ist trotz der gleichen T%- und C%-Werte sehr unterschiedlich zu reinen MBA-Gelen. Je höher der EDA-Anteil in gemischten Gelen ist, desto weiter läuft Cytochrom b im Tris-Tricin Puffersystem im Verhältnis zu Cytochrom c₁. Diese höhere Mobilität von hydrophoben Proteinen mit einem hohen Anteil an Transmembranhelices wird auch in normalen SDS-Gelen mit kleineren T%- und C%-Werten, also mit einer höheren Porosität beobachtet. Bei der dSDS wird dieser Effekt ausgenutzt, um eine getrennte Auflösung von Membran- und hydrophilen Proteinen zu erhalten [Rais 2004]. Dieses Verfahren könnte ebenfalls mit dem neuen Gelsystem durchgeführt werden.

Gele, die mit DHEBA vernetzt werden, sind mit der Silberfärbung kompatibel, wurden jedoch aus vorher genannten Gründen nicht eingesetzt. Werden MBA/EDA-Gele einer Silberfärbung unterzogen, kommt die Anfälligkeit des Systems in hohen pH-Bereichen zum Tragen. Bis jetzt gibt es noch keine Möglichkeit für eine verträgliche Silberfärbung dieser Gele. Alle anderen geprüften Färbemethoden sind voll kompatibel mit EDA-enthaltenden Gelsystemen. Auch andere in dieser Arbeit nicht geprüfte Visualisierungen, die im sauren bis neutralen pH-Bereich durchgeführt werden, sollten mit dem neuen Gelsystem verträglich sein.

5.2.4 In-Gel-Verdau

Das Protokoll des in-Gel-Verdaus muss nur geringfügig geändert werden. Vor der Proteolyse wird die Spaltung des *Crosslinkers* durchgeführt. Als basisches Reagenz wurde zunächst NaOH verwendet, um die Esterbindung des EDAs zu hydrolysieren. Damit der Proteolyseprozess – das pH-Optimum des überwiegend eingesetzten Enzyms Trypsin liegt ca. bei pH 8 – nicht gestört wird [Halfon 2004], muss der pH-Wert wieder eingestellt werden. Dies kann über mehrmaliges Waschen des Gelstücks mit Puffer bewerkstelligt werden. Als Alternative könnte durch eine äquimolare Menge an HCl neutralisiert werden, damit evtl. verlustbringende Waschschrte umgangen werden können. Doch selbst wenn nur kleine Mengen an Natronlauge verbleiben, führt dies zu starken Natriumanlagerungen an die Matrix, die sich in prominenten Matrixclustern im Spektrum manifestieren und das Signal der eigentlichen Probe supprimieren. Um diese Adduktbildung gänzlich zu vermeiden, fällt die Wahl auf das Reagenz Ammoniumhydroxid. Dieses muss in viel höheren Konzentrationen als NaOH eingesetzt werden, um den gleichen pH-Wert zu erreichen und der hohe Ammoniaküberschuss muss durch zusätzliche Waschschrte nach der Hydrolyse entfernt werden. Der Probenverlust durch diese Prozedur (Waschschrte) scheint vernachlässigbar zu sein, da das Ergebnis der adaptierten gemischten Gele trotzdem besser ist als das der normalen.

5.2.5 Massenspektrometische Analyse

In einigen Fällen sind die durch die *dried droplet*-Methode präparierten Spots nur sehr langsam getrocknet und zeigten eine schlechte Kristallisation. Dies könnte auf unzureichendes Waschen nach der Esterhydrolyse zurückzuführen sein. Zum Einen entsteht während dieser Behandlung Ethylenglykol als Spaltprodukt. Da Glykole im Allgemeinen als Feuchthaltemittel dienen, könnte dies die Ursache für die schlechte Trocknung des Spots sein. Durch vollständige Hydrolyse des EDAs bei einer Gelbandengröße von $10 \times 1,5 \times 0,75 \text{ mm}^3$ entstünden ca. 260 nmol Glykol. Dieser Überschuss entspricht ungefähr $2,5 \cdot 10^5$ Mal der Menge des zu untersuchenden Proteins. Allerdings ist Ethylenglykol zu 96% mit Wasser mischbar und sollte über die Waschschrte entfernt werden, so dass sich ein deutlich geringerer Anteil in der endgültigen Probe befinden sollte.

Eine weitere Ursache könnte der große Überschuss an Ammoniumionen darstellen. Der Salzgehalt der Proben ist sehr hoch, erst durch Waschen des Spots mit 5% kalter Ameisensäure kann dies reduziert werden. Allerdings wird im niedrigen Massenbereich eines MALDI-Spektrums immer noch ein starkes Ammonium-Signal detektiert. In manchen Fällen wird auch eine sehr unruhige Basislinie wahrgenommen.

Das neue Gelsystem mit auflösbaren Teilstrukturen erlaubt eine kontrollierbare Weitung der Gelporen und erleichtert dementsprechend die Diffusion der entstandenen Peptide. Der vollständige Austausch des Quervernetzers MBA gegen EDA zeigte neben einem veränderten Laufverhalten keine vorteilhaften Verbesserungen nach in-Gel Verdau und anschließender Auswertung per PMF. Die Anzahl der gefundenen Peptide war schlechter bis gleichwertig im Vergleich zu normalen Gelen. Durch das veränderte Laufverhalten bei zunehmendem EDA-Anteil ist anzunehmen, dass die Poren eines EDA-enthaltenden Gels größer sind. Dies könnte auch die Erklärung für diese Resultate sein, da evtl. schon vor dem Verdau ein Proteinverlust erfolgt. Das gesteigerte Quellverhalten von Gelen mit EDA-Anteil könnten diesen Prozess noch fördern. Die hierdurch inspirierten Änderungen des Färbeprozesses durch Verkürzung der Dauer durch Verwendung einer Mikrowelle oder der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen zeigten keinen Erfolg gegenüber dem Standardverfahren mit kolloidalem CBB. Auch Variationen des Verdauprotokolls wie die Änderung der Ammoniakinkubationsdauer oder Verwendung von Gelstreifen anstatt -stücken brachten keine Verbesserung. Die Erhöhung des T%- und C%-Wertes der Mischgele waren ebenfalls ohne Nutzen, da der Vergleich mit einem MBA-Gel stattfand, dessen T%- und C%-Werte ebenfalls erhöht wurden. Außerdem wurde die Menge des Quervernetzers MBA durch den gleichen Anteil an EDA ersetzt, was die Porengröße des Gels beeinflusste. Insgesamt können durch diese Ergebnisse die erhofften Vorteile des Gels aus gemischten *Crosslinkern* nicht bestätigt werden.

Das adaptierte gemischte Gelsystem wurde dann so entwickelt, dass die elektrophoretischen Trenneigenschaften eines regulären MBA-basierten Gels erhalten bleiben. In Folge dessen wurde das Protokoll für gemischte *Crosslinker*-Gele durch Änderung der Acrylamid- und Quervernetzerkonzentration empirisch optimiert. Die Erhöhung des T%-Werts um ~10% und des C%-Werts um ~45% mit eine MBA/EDA-Verhältnis von 1:2 (0,5) können als Standardwerte im Hinblick auf die Referenz betrachtet werden. Sowohl in Tris-Glycin- als auch in Tris-Tricin-Puffersystemen angewendete MBA/EDA-Gele mit dieser Adaption zeigen ein mit normalen MBA-Gelen äquivalentes

Laufverhalten und eine vergleichbare Auflösung. Es ist jedoch nicht bewiesen, da die Gele einen identischen Aufbau mit derselben Porengröße besitzen. Die adaptierten Parameter sind wahrscheinlich nicht in allen Fällen für Gele mit unterschiedlichen T%-Werten 1:1 übernehmbar, doch sowohl für oben beschriebenes Tris-Glycin als auch Tris-Tricin-System treffen sie zu. Erst nach dieser Adaption wurde auch die erhoffte Verbesserung des in-Gel Verdaus erzielt.

Da an der Durchführung der anschließenden *bottom-up*-Analyse keine Änderungen vorgenommen wurden, kann man aus diesem Ergebnis schließen, dass die Porengröße der Gele als der kritische Parameter bei der Entwicklung des neuen Gelsystems betrachtet werden kann. Bei einfachem Austausch von MBA durch EDA nimmt die Porosität wohl so zu, dass durch die vielen Schritte im Arbeitsverlauf Proteinverluste auftreten, die zu gleichwertigen PMF-Ergebnissen führen. Obwohl beim adaptierten Gelsystem durch Zunahme des T%- und C%-Werts die Porengröße sinkt, scheint durch die Hydrolyse der EDA-Bindung und dem damit verbundenen Schrumpfen des C%-Werts von 3,9 auf 1,3% ein positiver Effekt verbunden zu sein. Nach Schätzungen, die sich auf Kalkulationen für Tris-Acetat-EDTA gepufferte Polyacrylamidgele stützen, steigt der Porenradius im adaptierten Gelsystem von ca. 30 auf 100 nm an [Stellwagen 1998]. Zusätzlich zu der verbesserten Extraktion scheinen die erweiterten Poren auch eine bessere Zugänglichkeit der Protease zum in Gel eingebetteten Substrat zu ermöglichen.

Die Gelaufweitung führt zu signifikant besseren massenspektrometrischen Ergebnissen, die größtenteils auf die höheren S/N-Werte zurückzuführen sind. Werden die Spektren eines normalen Gels mit denen des neuen MBA/EDA-Gels verglichen, sind für die des gemischten Systems keine signifikanten negativen Aspekte zu vermerken. Eine unruhige Basislinie, wahrscheinlich ausgelöst durch einen höheren Salzgehalt in der Probe, kann in den Spektren der adaptierten Gele wahrgenommen werden. Die Peptide sind in beiden Spektren gleichwertig vertreten. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass z.B. hydrophobe Peptide durch das neue System besser extrahiert werden. Ein Verlust an kleineren Peptiden durch die zusätzlichen Waschschriffe während des in-Gel Verdaus kann nicht festgestellt werden, somit muss der durch die Aufweitung erhaltene Gewinn diesen Nachteil überwiegen. Erstaunlicherweise werden keine zusätzlichen Peptide im größeren Massenbereich detektiert. Die Annahme, dass diese durch die größeren Poren besser aus dem Gel extrahiert werden können, hat sich damit leider als nicht zutreffend erwiesen. Es scheint immer noch ein hoher Grad an Adsorption an die Gelfilamente vorzuliegen.

Möglich wäre auch, dass die Peptide zwar besser extrahiert werden können, sich jedoch an die hydrophoben Gefäßwände anlagern und damit der MS-Untersuchung trotzdem entzogen werden.

Die Zunahme an identifizierten Peptiden bei den tryptischen Verdaus liegt im Bereich von 15 bis 45%. Diese Resultate stimmen mit den veröffentlichten Berichten über Verluste während des in-Gel Verdaus überein [Speicher 2000; Stewart 2001], so dass angenommen werden kann, dass diese vor allem durch unzureichende Extraktion und Proteaseabsorption hervorgerufen werden. Während der Nachweis von 1 pmol BSA, Serotransferrin und ADH stark von den zusätzlich erhaltenen Daten profitiert, ist der Nutzen der zusätzlichen Informationen bei 1 pmol Amylase und Carboanhydrase eher untergeordnet. CAH ist ein eher kleines Protein (29 kDa), das für seine schwere Zugänglichkeit bei der tryptischen Proteolyse bekannt ist [Janecki 2005]. Die Sequenzabdeckung von 58%, die beim Verdau des Standards erreicht wird, ist schon ein zufriedenstellendes Resultat. Aus diesem Grund wurde kein weiterer Fortschritt erwartet. Für Amylase werden in einem *in silico*-Verdau 16 theoretische Peptide im Massenbereich von 850 bis 2500 Da generiert, wenn keine überlesenen Schnittstellen miteinbezogen werden. 12 dieser 16 Peptide werden in einem normalen MBA-Spektrum detektiert, so dass der Gewinn an zusätzlich zu erhaltenden Informationen eher marginal ist.

Auch bei kleinen Proteinmengen wie 250 und 50 fmol erweist sich das adaptierte Gelsystem als gut. Durch das mit diesen Mengen überschrittene Detektionslimits der CBB-Färbung muss auf gleicher Höhe von angefärbten konzentrierteren Proteinbanden ausgeschnitten werden. Mit dieser Prozedur werden in der Regel nicht so gute Resultate erhalten, da das „blind ausschneiden“ einen größeren Fehler mit sich bringt und die PMF-Ergebnisse somit negativ beeinflusst. Trotz dieser Umstände werden für BSA Peptidzahlen erhalten, die mehr als doppelt so hoch sind als die des Standards.

Bei der Untersuchung von möglichen PTMs von Proteinen ist davon auszugehen, dass die Detektion von Phosphorylierungen nicht möglich ist, da die Phosphatgruppe wie auch andere Ester im stark basischen Milieu hydrolysiert wird. Eine Pyroglutamatmodifikation von N-terminalem Glutamin wie z.B. bei BR, scheint dagegen unbeeinflusst zu bleiben. Eine auffällige Beobachtung ist, dass Tryptophan-haltige Peptide in MBA/EDA-Gelen zu Oxidationen neigen. Zwar wurden solche Peptide nicht per MS/MS bestätigt, zeichnen sich aber durch einfach bzw. zweifach oxidierte Formen ähnlich denen von Methionin aus. Außerdem konnten diese Signale nach Standardverdau und auch bei Proteinen, die kein

Tryptophan enthalten, nicht festgestellt werden. Folglich muss die Behandlung mit Ammoniak die Oxidationen fördern.

Ob es sich hierbei ausschließlich um die Auswirkungen der basischen Behandlung der Gele oder um eine Verunreinigung des Ammoniumhydroxids durch ein Oxidationsmittel handelt, kann nicht eindeutig belegt werden. In der Literatur sind zwar Tryptophanoxidationen beschrieben, die auch in alkalischem Milieu auftreten, jedoch immer in Kombination mit oxidierenden Stoffen wie Peroxid, Metallen etc. [Simat 1998; Karty 2002; Froelich 2008]. Die Tryptophan-Oxidationen stellen im ersten Moment einen Nachteil dar, weil somit eine zusätzliche potentielle Modifikation in die Datenbanksuche miteinbezogen werden muss. Für die Suche von kleinen Proteinen könnten sie jedoch von Vorteil sein, da mehr Peptide und somit auch mehr Identifizierungsmöglichkeiten resultieren. Auch die Proteine Amylase und CAH, bei denen sich der Vorteil des adaptierten Gelsystems am wenigsten zeigte, würden davon sehr profitieren (siehe Tab. 9.2 und 9.4)

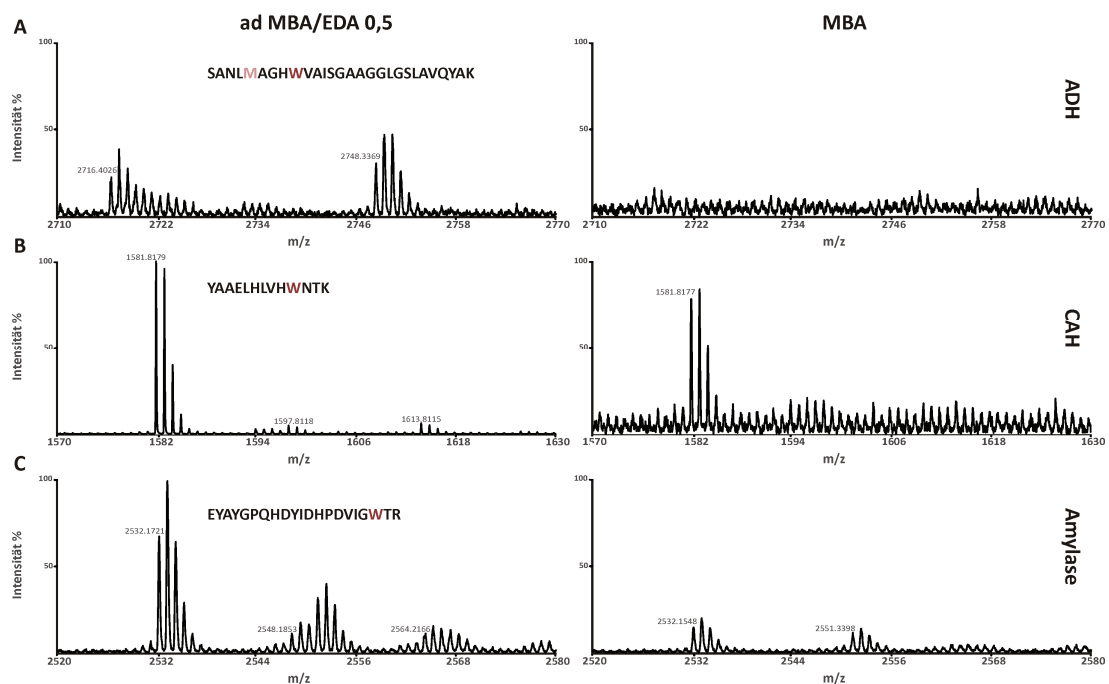


Abb. 5.2 Tryptophanoxidationen

Ausgewählte MS-Spektren von Peptiden, die oxidierte Tryptophanreste enthalten. (A) ADH, (B) CAH, (C) Amylase; 1 pmol pro Gelbande

5.2.6 2D-PAGE

Es ist üblich, die Probe durch Präzipitation aufzureinigen, um den Ablauf einer IEF durch zu hohe Salzkonzentrationen nicht zu stören. Die Fällung der cytosolische *C. glutamicum*-Probe durch TCA erlaubt somit eine bessere Auftrennung der Proteine mittels IEF. Anhand der Gelbilder (Abb. 4.38) zeigt sich jedoch, dass hierdurch auch ein Teil der Proteine verloren geht. Auffällig ist der Schwund eines hochkonzentrierten Proteins im Bereich von 90 kDa und weiteren gut angefärbten Banden im hohen Massenbereich. Da die Proteine durch die Säure denaturiert werden, besteht die Möglichkeit, dass gerade größere Proteine schwer wieder in Lösung gebracht werden können und sich somit der Analyse entziehen. Im Gegensatz dazu ist ein Protein (ca. 21 kDa) besser zu detektieren, weil es evtl. durch die Fällung aufkonzentriert wird. Im Allgemeinen überwiegt jedoch der Proteinverlust und somit wird sich die Probenmenge von 200 µg des cytosolischen Extrakts nach der TCA-Fällung auch erheblich reduziert haben.

Die adaptierten MBA/EDA-Gele sind vollständig mit der Technik der 2D-PAGE kompatibel. In der zweiten Dimension wird ein komplexes Spotmuster erhalten, dessen Auflösung leicht verbessert gegenüber der eines normalen Standardgels ist, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Übergang zwischen IPG-Streifen und dem neuen Gelsystem ohne Probleme erfolgt. Sowohl die pI-Werte also auch die molaren Massen der per PMF-identifizierten Peptide stimmen gut mit den Positionen innerhalb des Gels überein. Der Vergleich der Peptidanzahl zeigt jedoch keinen signifikanten Vorteil der adaptierten MBA/EDA-Gele. Durch die zusätzliche Dimension der IEF kommt jedoch eine weitere potentielle Fehlerquelle hinzu.

Bei der Analyse der MS/MS-Ergebnisse zeigen einige Peptide, die aus der MBA/EDA-Probe generiert wurden, deutlich bessere *Ion Score*-Werte als ihre aus normalen Gelen stammenden Gegenstücke (Tab. 9.7). Es ist eine klare Proteinabhängigkeit zu beobachten, da falls eine Peptidgruppe höhere *Scores* erzielt, diese in der Regel von ein und demselben Protein stammen, wie beispielsweise die der Enolase (Abb. 4.40, Spot 7). Bei deren sieben fragmentierten Peptiden sind die *Ion Scores* durchschnittlich um 31 Punkte, die max. Werte um 45 Punkte besser als die der Standards. Ähnlich positiv sieht es bei der Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase B (Abb. 4.40, Spot 15) aus, deren sechs ausgewertete Peptide im Schnitt um 20 Punkte besser sind. Es kann jedoch in keinem dieser Fälle ein Zusammenhang mit dem pI oder *GRAVY-Score* gezogen werden. Es wäre aber

vorstellbar, dass sich der S/N-Wert im PMF der gemischten Gele zwar nicht in einer höheren Anzahl an Peptiden niederschlägt, dafür aber eine bessere Fragmentierung ermöglicht wird. Insgesamt sind die neuen MBA/EDA-Gele sehr gut für mehrdimensionale Gel-basierte Trenntechniken wie z.B. IEF/SDS-PAGE geeignet. Es sollten auch keine Kompatibilitätsprobleme mit anderen Gelelektrophoresemethoden oder kombinierten *Proteomics*-Techniken wie bspw. „GeLC“ (SDS-PAGE/nLC) [Simpson 2000] geben, solange der pH-Wert im sauren bis leicht basischen Bereich gehalten wird.

5.2.7 In-Gel Verdau mit Elastase und Pepsin

Beim Einsatz weniger spezifischer Enzyme soll die vielfältige Anwendbarkeit des neuen Gelsystems mit anderen Proteasen als Trypsin gezeigt werden. Die Verdauspektren von BR mit Elastase zeigen für das gemischte Gel – wie auch in den Spektren des Trypsinverdaus – einen verbesserten S/N-Wert um den Faktor 3, der zu einer Zunahme an zugeordneten Peptidsignalen führt. Vor allem in der N-terminalen Proteinregion bis Aminosäure 80 wird eine vermehrte Zuordnung von Peptiden im Gegensatz zum Standard erreicht. Durch die größeren Poren scheint dieser Bereich für das Enzym besser zugänglich zu sein. Da Elastasepeptide häufig in *Clustern* auftreten, ist ihre Beobachtung ein weiterer signifikanter Hinweis für die Richtigkeit der Signale. Wichtig bei der Auswertung von Elastaseverdaus mittels PMF ist eine hohe Massengenauigkeit. In diesem Fall konnte diese durch interne Nachkalibrierung erzielt werden, da es sich um eine bekannte Probe handelt. Besser wäre es ein Massenspektrometer zu verwenden, das an sich eine hohe Genauigkeit hat wie z.B. die MALDI Orbitrap.

Für das Enzym Pepsin gilt prinzipiell das gleiche wie für die Elastase. Zur Richtigkeit der Auswertung tragen die Berücksichtigung einer Clusterbildung sowie eine hohe Massengenauigkeit bei, insgesamt ist die Auswertung der Ergebnisse jedoch wesentlich schwieriger. Während Elastase noch eine relative hohe Spezifität für die Aminosäuren AVLIST aufweist, kann für Pepsin nur eine Bevorzugung der Aminosäuren FLEA angenommen werden, da lediglich 55% der Schnitte bzw. 40% unter Berücksichtigung des natürlichen Vorkommens hierdurch abgedeckt werden. Aus diesem Grund wurde auch zusätzlich ohne Enzymspezifität gesucht.

Für eine bessere Massengenauigkeit werden die intensivsten Signale per MS/MS fragmentiert und verifiziert, um eine genaue Zuordnung und damit eine genaue Masse für

die Kalibrierung zu ermitteln. Dabei zeigt sich, dass nicht-tryptische Peptide oftmals schlecht fragmentieren, da sie keine basische Gruppe am C-Terminus haben, welche die Ausbildung einer Ionenserie induziert und so die Zuordnung der Fragmentationensignale erschwert wird. In diesem Fall (Abb.4.32) ist das höchste Signal das y_4 -Peptid, da es durch einen N-terminalen Bruch zu Prolin entstanden ist. Insgesamt ist das Spektrum jedoch recht arm an intensiven Signalen.

Die Proteolyse von Proteinen durch Pepsin wurde bisher in Gelen noch nicht durchgeführt. Da die molare Masse des Enzyms (34,6 kDa) im Vergleich zu Trypsin oder Elastase ca. um 10 kDa größer ist, wurde Pepsin bisher noch nicht als potentielle Protease zum Verdau in Gelen in Betracht gezogen, da hier die Grenze bei ca. 25 kDa gesetzt wird [Rabilloud 2009]. Das signalreiche Spektrum des Amylaseverdaus beweist, dass eine Zugänglichkeit des Enzyms auch schon bei normalen Gelen gegeben ist (Abb. 4.35A). Die Autoproteolyse des Pepsins scheint nicht allzu stark ausgeprägt zu sein. Lediglich ein einziges, dafür aber sehr intensives Signal sticht hervor. Alle Spektren zeichnen sich durch eine sehr hohe, unruhige Basislinie aus (siehe vergrößerte Bereiche Abb. 4.35), wahrscheinlich ausgelöst durch Bildung eines Salzes aus NH_4^+ und TFA^- .

Bei Vergleich der Peptidzahlen der Schnittspezifität FLEA schneidet das normale Gelsystem besser ab als die MBA/EDA-Gele. Insgesamt werden aber nur sehr wenige Peptide zugeordnet, so dass dieses Ergebnis im Vergleich zu einem tryptischen Verdau als nicht ausreichend betrachtet werden muss (Abb.4.33A). Wird jedoch ohne Spezifität gesucht, erhöht sich die Peptidanzahl für alle 3 Gelsysteme drastisch und für die MBA/EDA-Mischung ohne Adaption werden die besten Resultate erhalten. Dies zeigt die mangelnde Schnittspezifität des Pepsins, allerdings könnten viele Zuordnungen auch falschpositiv sein. Wie bei Elastase zeigt sich eine Clusterbildung in bestimmten Proteinbereichen. Diese Anhäufung mehrerer Peptide in einem bestimmten Sequenzbereich tritt unter Berücksichtigung von Mehrfachzuordnungen (Abb. 4.34 C) deutlicher zu Tage. Erstaunlich ist, dass im Gegensatz zu den tryptischen Proteolysen das MBA/EDA-Gel 0,5 ohne Adaption die besten, das adaptierte Gelsystem dagegen die schlechteren Ergebnisse liefert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die erhöhte Porengröße der Gele ohne Adaption die Proteolyse positiv beeinflusst. Der Zugang des 35 kDa großen Pepsins zum Substrat wird durch die weiteren Poren erleichtert, so dass die Spalteffizienz erhöht wird. Verluste bei der Peptidextraktion scheinen hierbei nicht ins Gewicht fallen oder durch die verbesserte Proteaseabsorption ausgeglichen zu werden. Bei

den tryptischen Experimenten war dieser Faktor noch ein Grund für schlechtere Verdauergebnisse. Desweiteren muss erwähnt werden, dass Pepsin im sauren Milieu am besten schneidet. Bei der Hydrolyse des EDA-Anteils der gemischten Gele mit Ammoniumhydroxid liegt jedoch ein stark basischer pH-Wert vor. Zwar wird dieser durch Waschen mit Pufferlösung (\sim pH 8) reduziert, es wäre jedoch möglich, dass Rückstände den durch 0,1% TFA eingestellten pH-Wert beeinflussen. Dieses könnte die unterschiedlichen Ergebnisse der gemischten Gele erklären, da je nach vorliegendem pH-Wert die Aktivität und Spalteffizienz des Pepsins beeinflusst wird [Takahashi 2004]. Durch die Zugabe eines organischen Lösungsmittels wie Acetonitril oder Methanol könnte die Proteolyse noch verbessert werden.

Im Gegensatz zu Elastase sind die Ergebnisse nicht so gut reproduzierbar. Von den drei verdauten Proteinen lässt lediglich Amylase eine Auswertung mittels PMF zu. Die CAH-Proteolyse liefert keine auswertbaren Spektren. Das Protein Myoglobin zeigt nur ein hohes Signal (Abb. 5.3A), das fragmentiert (Abb. 5.3B) und mit dem intensiven Autoproteolysepeptid des Pepsins zur internen Kalibrierung herangezogen werden kann. Es werden relativ wenige Peptide im PMF zugeordnet, obwohl ausreichend potentielle Schnittstellen vorhanden wären (Abb. 5.3C). Die hohe Anzahl an Spaltmöglichkeiten (bei Suchspezifität FLEA sind es schon 52 von 153 Aminosäuren) könnte jedoch dazu führen, dass zu kleine Peptide generiert werden, die unterhalb des erfassten Massenbereichs liegen. Außerdem könnte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung für die PMF-Suche einfach nicht ausreichend sein.

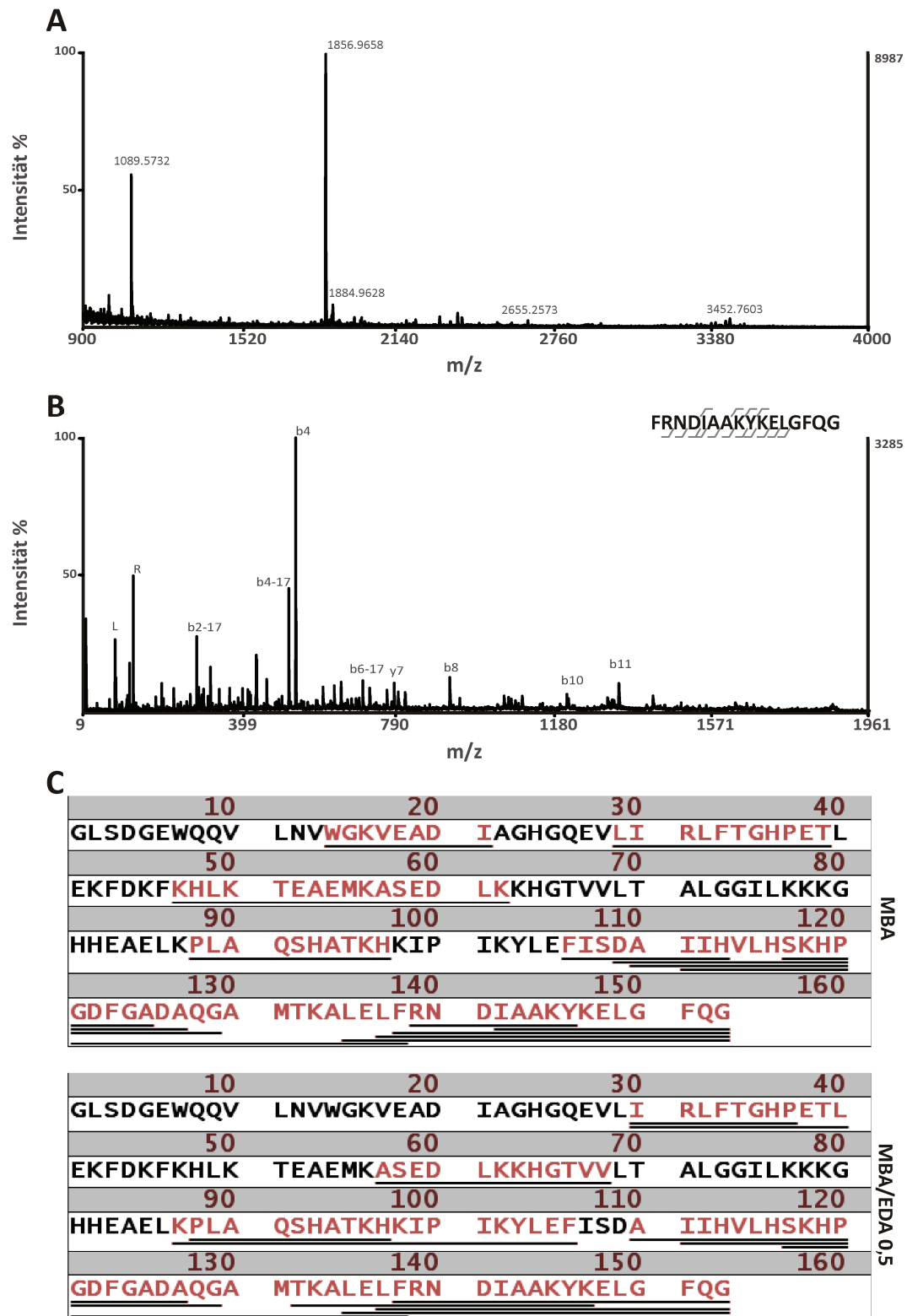


Abb. 5.3 Pepsin-Proteolyse von Myoglobin

(A) PMF von Myoglobin (B) MS/MS des Peptids 1856,97 Da; graue Markierungen in der Sequenz geben nachgewiesene b- und y-Ionen an (C) identifizierte Peptide ohne Enzymspezifität ohne Berücksichtigung von Mehrfachzuordnungen; Proteinmenge: 1 pmol/Gelbande

5.2.8 Ausblick

Der Ansatz des Gelsystems mit gemischten Quervernetzern hat sein Potential hinsichtlich des Einsatzes bei enzymatischer Proteolyse im Gel bewiesen. Sowohl nach tryptischem als auch nach elastatischem Verdau konnten bessere Ergebnisse erzielt werden als nach der Proteolyse in einem Standardgel. Weitere Proteasen wie Chymotrypsin oder Lys-C sollten aufgrund ihrer ähnlichen Größe zu den verwendeten Enzymen ebenfalls erfolgreich angewendet werden können. Größere Enzyme wie das bereits eingesetzte Pepsin erfordern eventuell eine Anpassung der Aufweitung der Porengröße. Da die Pepsin-Ergebnisse jedoch stark pH-abhängig sind, wäre eine Evaluierung des adaptierten Gelsystems für größere Proteasen mit dem spezifisch schneidenden Enzym Glu-C (35 kDa) eine interessante Alternative.

Die aufweitbare Gelstruktur könnte jedoch auch für die Analyse von intakten Proteinen ein vielversprechender Ansatz sein. Bisher werden intakte Proteine durch Diffusion oder Elektroelution aus der Gelmatrix isoliert. Allerdings erfolgen diese Prozeduren eher im präparativen Maßstab [Seelert 2008], so dass ein hundertprozentiges Herauslösen der Proteinmenge nicht nötig ist. Außerdem erfordern diese Methoden Zeit oder eine spezifische Apparatur. Für kleine in der Proteinanalytik verwendete Probenmengen ist eine vollständige Elution des Proteins aus dem Gel nötig, um anschließend *Top-Down*- oder *Bottom-up*-Ansätze durchführen zu können. Der Einsatz von Gelen mit auflösbaren Teilstrukturen begünstigt die Peptidextraktion nach einem in-Gel Verdau und könnte somit auch eine erleichterte Extraktion und somit eine komplette Elution von größeren Peptiden und intakten Proteinen aus dem Gel erlauben, so dass auch im analytischen Maßstab gearbeitet werden kann. Außerdem werden keine speziellen Geräte benötigt und die Hydrolyse kann einfach und schnell durchgeführt.

Es wurden zwar schon Untersuchungen in diesem Feld mit gemischten als auch mit reinen EDA-Gelen unternommen, jedoch noch keine qualitativ guten Spektren erhalten. Ein Grund hierfür ist die schlechte Kristallisation, ausgelöst durch Salzverunreinigungen oder Ethylenglykol. Diese können zwar durch ZipTip®-Aufreinigung abgetrennt werden, doch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial könnten auch einen Probenschwund zur Folge haben. Ein Verlust an Protein durch die Auflösung des Gels wäre ebenfalls möglich. Dieser Ansatz hat ein großes Potential zur Analyse von intakten Proteinen nach der gelelektrophoretischen Trennung, die einzelnen Schritte wie die Extraktion müssen allerdings noch optimiert werden.

6. Zusammenfassung

Als Teil der Atmungskette des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus* besteht die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus 13 Untereinheiten, die durch 24 unterschiedliche Gene codiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für den massenspektrometrischen Nachweis dieser Untereinheiten nach der Aufreinigung des Komplexes eine SDS-PAGE durchgeführt, an die sich eine tryptische Proteolyse und eine Messung per MALDI MS und MS/MS anschlossen. Mit dieser analytischen Strategie war es möglich, jede nicht-homologe Untereinheit nachzuweisen und 20 von 24 genombasierten Isoformen eindeutig zu identifizieren. Selbst kleine bzw. sehr hydrophobe Untereinheiten mit vielen Transmembranhelices konnten mit Hilfe dieser Methode analysiert werden. Die hohe Anzahl an präsenten, unterschiedlichen Isoformen und die vorherrschenden Verunreinigungen durch Fremdproteine (z.B. ATP-Synthase) könnten Indizien dafür sein, dass bis jetzt keine hinreichend stabile und reproduzierbare Enzympräparation gelungen ist, um eine Kristallstrukturanalyse durchzuführen.

Im Allgemeinen kann der Ablauf eines solchen *Proteomics*-Experiments in drei Teile gegliedert werden: die Auftrennung eines Protein- oder Peptidgemischs zur Verringerung der Probenkomplexität, die Identifikation des Proteins per Massenspektrometrie und die damit verbundene bioinformatische Datenanalyse. Neben chromatographischen Methoden ist die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen immer noch das am häufigsten angewandte Trennverfahren im *Proteomics*-Bereich. Vor der MS-Messung werden die aufgetrennten Proteine in der Regel direkt in der Gelmatrix verdaut. Die Qualität der Ergebnisse wird stark durch Proteinmenge und die auftretenden Probenverluste beeinflusst. Diese werden beispielsweise durch eine unzureichende Peptidextraktion aus dem Gel hervorgerufen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein neues Gelsystem entwickelt, dass vor allem für die Proteolyseeffizienz, die Peptidextraktion und somit auch für die anschließende massenspektrometrische Messung von Vorteil ist. Das Monomer Acrylamid wird hierzu mit den beiden Quervernetzern *N,N*-Methylenbisacrylamid (MBA) und Ethylenglykoldiacrylat (EDA) polymerisiert. Es entsteht ein Gel, dessen Poren durch die basische Hydrolyse der Esterbindungen des EDAs vergrößert werden können, ohne die dreidimensionale Grundstruktur des Gels zu zerstören.

Die gemischten Gele mit MBA und EDA als *Crosslinkern* sind sowohl für Tris-Glycin- als auch Tris-Tricin-Puffersysteme einsetzbar. Die Evaluierung der Daten erfolgte meist gegen ein Standardgel mit T= 14% und C= 2,6%. Durch eine experimentell ermittelte Anpassung der Mischgele auf T+10% und C+45% mit einem MBA/EDA-Verhältnis von 0,5 verhalten sich die beiden Gelsysteme empirisch gleich und zeigen eine übereinstimmende elektrophoretische Trennung und Auflösung. Es gibt keine wesentlichen Nachteile in Bezug auf die Handhabung, die elektrophoretische Trennung und die anschließenden Analysen und Techniken, solange diese in sauren bis leicht basischen pH-Bereichen durchgeführt werden. So wurde das gemischte Gelsystem sowohl bei einer 2D IEF/SDS-PAGE als auch bei einem Western Blot-Experiment angewendet und für vollständig kompatibel befunden.

Die gemessenen MS-Daten profitieren im Fall von Trypsin und Elastase erheblich von der besseren Zugänglichkeit des Enzyms zum Substratprotein und der verbesserten Peptidextraktion. Die Gelaufweitung führt zu signifikant besseren Ergebnissen, die größtenteils auf höhere S/N-Werte zurückzuführen sind. Die Signalintensitäten der Peptide sind um den Faktor 5 besser als die des Referenzgels. Der Nachweis von je 1 pmol der Proteine BSA, Serotransferrin und Alkoholdehydrogenase profitiert stark von den zusätzlich erhaltenen Daten, da die Zunahme an identifizierten Peptiden bei der PMF-Suche im Bereich von 40 bis 80% liegt. Auch bei geringen Proteinmengen wie 250 bzw. 50 fmol BSA ist die Anzahl der zugeordneten Signale um den Faktor 2-3 besser. Der in-Gel Verdau von 1 pmol Bacteriorhodopsin mit Elastase zeigt ebenfalls einen Anstieg der Peptidsignale um 60% im Vergleich zum Referenzgel.

Da die Proteine im Gel alle mit kolloidalem *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sich die guten MS-Ergebnisse auf jede mit diesem Farbstoff visualisierte Probe übertragen lassen. Für den Fluoreszenzfarbstoff RuPBS trifft dies ebenso zu, insgesamt wurden aber weniger Peptide als bei kolloidaler *Coomassie Brilliant Blue*-Färbung detektiert.

Dementsprechend handelt es sich bei Acrylamidgelen mit MBA/EDA-Vernetzung um ein vielversprechendes alternatives Gelsystem, dass auf eine Vielzahl anderer Methoden angewendet werden kann.

7. Referenzen

- Aebersold R, Hood LE, Watts JD: *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 359
- Aebersold R, Goodlett DR: *Chem. Rev.* **2001**, 101, 269-295
- Alberts B (Ed.): *Garland Publishing, Inc*, New York **1994**, 485-488
- Alpers DH, Glickmann R: *Anal. Biochem.* **1970**, 35, 314-320
- Anderson LE, McClure WO: *Anal. Biochem.* **1973**, 51, 173-179
- Anderson NL, Anderson NG: *Mol Cell Proteomics* **2002**, 1, 845-867
- Anker HS: *FEBS Lett.* **1970**, 7, 293
- Aston FW: *Phys. Rev.* **1918**, XI, 316
- Bahr U, Stahl-Zeng J, Gleitsmann E, Karas M: *J Mass Spectrom.* **1997**, 32, 1111-1116
- Barber M, Powers P, Wallington MJ, Wolstenholme PA: *Nature* **1966**, 212, 784-787
- Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler AN: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 325-327
- Bean MF, Carr SA, Thorne GC, Reilly MH, Gaskell SJ: *Anal Chem.* **1991**, 63, 1473-1481
- Beavis RC, Chait BT: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1989a**, 3, 432-435
- Beavis RC, Chait BT: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1989b**, 3, 436-439
- Beavis RC, Chait BT: *Chem. Phys. Lett.* **1991**, 181, 479-484
- Beavis RC, Chaudhary T, Chait RT: *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27, 156-158
- Beckey HD: *Naturwissenschaften* **1958**, 45, 259
- Beckey HD: *Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1969**, 2, 500-502
- Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg TH, Kemper C, Lopez MF, Diwu Z, Haugland RP, et al.: *Electrophoresis* **2000**, 21, 2509-2521
- Bergmann T, Martin TP, Schaber H: *Rev. Sci. Instrum.* **1989**, 60, 792-793
- Biemann K, Cone C, Webster BR, Arsenault GP: *Journal of the American Chemical Society* **1966**, 88, 5598-5606
- Biemann K: *Methods Enzymol.* **1990**, 193, 886-887
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W: *J Biochem Biophys Methods.* **1982**, 6, 317-339
- Bleakney W: *Phys. Rev.* **1929**, 34, 157-160
- Blonder J, Conrads TP, Yu LR, Terunuma A, Janini GM, Issaq HJ, Vogel JC, et al.: *Proteomics* **2004**, 4, 31-45
- Borchers C, Parker CE, Deterding LJ, Tomer KB: *J Chromatogr A.* **1999**, 854, 119-130
- Boyle JG, Whitehouse CM, Fenn JB: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, 5, 400-405
- Brandt U, Kerscher S, Drose S, Zwicker K, Zickermann V: *FEBS Letters* **2003**, 545, 9-17
- Brandt U: *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75, 69-92

- Brown RS, Lennon JJ: *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1998-2003
- Bruce JE, Anderson GA, Wen J, Harkewicz R, Smith RD: *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2595-2599
- Burnette WN: *Anal. Biochem.* **1981**, 112, 195-203
- Bury AF: *J Chromatogr* **1981**, 213, 491-500
- Cameron** AE, Eggers DF: *Rev. Sci. Instrum.* **1948**, 19, 605-607
- Cañas B, Piñeiro C, Calvo E, López-Ferrer D, Gallardo JM: *J Chromatogr A* **2007**, 1153, 235-258
- Capelo JL, Carreira R, Diniz M, Fernandes L, Galesio M, Lodeiro C, Santos HM, et al.: *Anal. Chim. Acta.* **2009**, 650, 151-159
- Castellanos-Serra, LR, Fernandez-Patron C, Hardy E, Huerta V: *Electrophoresis* **1996**, 17, 1564-1572
- Cawley LP, Minard BJ, Tourtellotte WW, Ma BI, Chelle C: *Clin. Chem.* **1976**, 22, 262-268
- Chevalier F, Rofidal V, Vanova P, Bergoin A, Rossignol M: *Phytochemistry* **2004**, 65, 1499-1506
- Chi A, Bai DL, Geer LY, Shabanowitz J, Hunt DF: *Int J Mass Spectrom* **2007**, 259, 197-203
- Choe L, D'Ascenzo M, Relkin NR, Pappin D, Ross P, Williamson B, Guertin S, et al.: *Proteomics* **2007**, 7, 3651-3660
- Choi JK, Yoon SH, Hong HY, Choi DK, Yoo GS: *Anal. Biochem.* **1996**, 236, 82-84
- Choi JK, Chae HZ, Hwang SY, Choi HI, Jin LT, Yoo GS: *Electrophoresis* **2004**, 25, 1136-1141
- Choules GL, Zimm BH: *Anal. Biochem.* **1965**, 13, 336-344
- Clason T, Ruiz T, Schägger H, Peng G, Zickermann V, Brandt U, Michel H, et al.: *J Struct Biol.* **2010**, 169, 81-88
- Clauser KR, Baker P, Burlingame AL: *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2871-2882
- Cohen SL, Chait BT: *Anal. Chem.* **1996**, 68, 31-37
- Colby SM, King TB, Reilly JP: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 865-868
- Comisarow MB, Marshall AG: *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 25, 282-283
- Cordwell SJ, Wilkins MR, Cerpa-Poljak A, Gooley AA, Duncan M, Williams KL, Humphery-Smith I: *Electrophoresis* **1995**, 16, 438-443
- Cornish TJ, Cotter RJ: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1994**, 8, 781-785
- Covey TR, Bonner RF, Shushan BI, Henion J: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1988**, 2, 249-256
- Covey TR, Huang EC, Henion JD: *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1193-1200
- Davis** MT, Lee TD: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, 8, 1059-1069
- Dawson JHJ, Guilhaus M: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, 3, 155-159
- Davis BJ: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1964**, 121, 404-427
- Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, Young WG, Lenox AL, Graham DE, Overbeek R, et al.: *Nature* **1998**, 392, 353-358
- Degli Esposti M, Ghelli A: *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, 1187, 116-120
- Dempster AJ: *Phys. Rev* **1917**, XI, 316
- Dole M, Mack LL, Hines RL: *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2240-2249
- Domon B, Aebersold R: *Science* **2006**, 312, 212-217

- Ducret A, Van Oostveen I, Eng JK, Yates JR III, Aebersold R: *Protein Sci.* **1998**, 7, 706-719
- Edman P, Begg G: *Eur J Biochem.* **1967**, 1, 80-91
- Ehring H, Karas M, Hillenkamp F: *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27, 472-480
- Emmett MR, Caprioli RM: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5, 605-613
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5, 976-989
- Eriksson J, Chait BT, Fenyo D: *Anal. Chem.* **2000**, 72, 999-1005
- Fazekas de St Groth S, Webster RG, Datyner A: *Biochim.Biophys. Acta* **1963**, 71, 377-391
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: *Science* **1989**, 246, 64-71
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SK, Whitehouse CM: *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, 9, 37-70
- Fenner NC, Daly NR: *Rev. Sci. Instr.* **1966**, 37, 1068-1070
- Fenyő D, Qin J, Chait BT: *Electrophoresis* **1998**, 19, 998-1005
- Fenyő D, Beavis RC: *Mass Spectrom Rev.* **2008**, 27, 1-19
- Ferguson KA: *Metab. Clin. Exp.* 1964, 13, 985-1002
- Fernandez-Patron C, Castellanos-Serra L, Rodriguez P: *Biotechniques* **1992**, 12, 564-573
- Figeys D, Corthals GL, Gallis B, Goodlett DR, Ducret A, Corson MA, Aebersold R: *Anal Chem.* **1999**, 71, 2279-2287
- Fischer F, Wolters D, Rögner M, Poetsch A: *Mol Cell Proteomics* **2006a**, 5, 444-453
- Fischer F, Poetsch A: *Proteome. Sci.* **2006b**, 4, 1-12
- Florens L, Washburn MP: *Methods Mol Biol.* **2006**, 328, 159-175
- Fountoulakis M, Juranville JF, Jiang L, Avila D, Roder D, Jakob P, Berndt P, et al.: *Amino Acids* **2004**, 27, 249-259
- Fournier ML, Gilmore JM, Martin-Brown SA, Washburn MP: *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3654-3686
- Fraser CM, Fleischmann RD: *Electrophoresis* **1997**, 18, 1207-1216
- Friedrich T, Bottcher B: *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, 1608, 1-9
- Froelich JM, Reid GE: *Proteomics* **2008**, 8, 1334-1345
- Fu Q, Van Eyk JE: *Expert Rev Proteomics* **2006**, 3, 237-249
- Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF: *Curr Opin Chem Biol* **2007**, 11, 66-73
- Ge Y, Lawhorn BG, ElNaggar M, Strauss E, Park JH, Begley TP, McLafferty FW: *J Am Chem Soc* **2002**, 124, 672-678
- Gelfi C, Righetti PG: *Electrophoresis* **1981**, 2, 213-219
- Gelpí E: *J Mass Spectrom.* **2008**, 43, 419-435
- Gelpí E: *J Mass Spectrom.* **2009**, 44, 1137-11
- Gevaert K, Vandekerckhove J: *Electrophoresis* **2000**, 21, 1145-1154
- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, et al.: *Nature* **2004**, 428, 493-521
- Glish GL, Goeringer DE: *Anal. Chem.* **1984**, 56, 2291-2295
- Good DM, Wirtala M, McAlister GC, Coon JJ: *Mol Cell Proteom* **2007**, 6, 1942-1951

- Goodlett DR, Keller A, Watts JD, Newitt R, Yi EC, Purvine S, Eng JK, et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2001**, 15, 1214–1221
- Görg A, Postel W, Gunther S: *Electrophoresis* **1988**, 9, 531–546
- Görg A, Drews O, Lück C, Weiland F, Weiss W: *Electrophoresis* **2009**, 30, S122–132
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, et al.: *Science* **1996**, 274, 563–567
- Grabar P, Williams CA: *Biochim Biophys Acta*. **1953**, 10, 193–194
- Grabar P, Nowinski WW, Generaux, BD: *Nature* **1956**, 178, 430–431
- Granvogl B, Plösch M, Eichacker LA: *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 991–1002
- Grigorieff N: *J. Mol. Biol.* **1998**, 277, 1033–1046
- Guilhaus M, Selby D, Mlynski V: *Mass Spec Rev*, **2000**, 19, 65–107
- Guiral M, Prunetti L, Lignon S, Lebrun R, Moinier D, Giudici-Orticoni MT: *J Proteome Res.* **2009**, 8, 1717–1730
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R: *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 994–999
- Haebel S, Albrecht T, Sparbier K, Walden P, Korner R, Steup M: *Electrophoresis* **1998**, 19, 679–686
- Halfon S, Baird TT, Craik CS: Trypsin, *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2nd Ed, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2004**
- Hames BD, Rickwood D: *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, Oxford University Press, New York, **1990**
- Hampel M, Sehnert B, Karas M, Jäck HM, Mielenz D: *Signal Transduction-Receptors, Mediators and Genes* **2005**, 6, 185–189
- Hamuro Y, Coales SJ, Molnar KS, Tuske SJ, Morrow JA: *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, 22, 1041–1046
- Han J, Schey KL: *J Proteome Res* **2004**, 3, 807–812
- Han X, Aslanian A, Yates JR III: *Curr. Opin. Chem. Biol*, **2008**, 12, 483–490
- Hansen JN: *Anal. Biochem.* **1976**, 76, 37–47
- Hartinger J, Stenius K, Högemann D, Jahn R: *Anal. Biochem.* **1996**, 240, 126–133
- Havlis J, Shevchenko A: *Anal Chem.* **2004**, 76, 3029–3036
- Haynes PA, Gygi SP, Figeys D, Aebersold R: *Electrophoresis* **1998**, 19, 1862–1871
- Hellmann U, Wernstedt C, Gonez J, Heldin CH: *Anal. Biochem.* **1995**, 224, 451–455
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90, 5011–5015
- Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 931–942
- Higgs RE, Knierman MD, Gelfanova V, Butler JP, Hale JE: *J Proteome Res.* **2005**, 4, 1442–1450
- Hillenkamp F, Karas M, Holtkamp D, Klüsener P: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1986**, 69, 265–276
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT: *Anal Chem.* **1991**, 63, 1193A–1203A
- Hillenkamp F, Karas M: *Int J Mass Spectrom*, **2000**, 200, 71–77
- Hjertén S: *Biochim Biophys Acta.* **1961**, 53, 514–517

- Hjertén S: *Arch Biochem Biophys.* **1962**, Suppl 1, 147-151
- Hjertén S, Jerstedt S, Tiselius A: *Anal Biochem.* **1969**, 27, 108-129
- Hochstrasser DF: *Clin. Chem. Lab. Med.* **1998**, 36, 825-836
- Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi L, Michel H, Sevilir N, Cox AL, et al.: *Science* **1992**, 255, 1261-1263
- Hunzinger C, Wozny W, Schwall GP, Poznanovic S, Stegmann W, Zengerling H, Schoepf R, et al.: *J Proteome Res* **2006**, 5, 625-633
- Issaq HJ, Chan KC, Janini GM, Conrads TP, Veenstra TD: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2005**, 817, 35-47
- James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 195, 58-64
- Janecki DJ, Reilly JP: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 1268-1272
- Jansson M, Warell C, Levander F, James PM: *J Proteome Res* **2008**, 7, 659-665
- Jaskolla TW, Lehmann WD, Karas M: *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**, 105, 12200-12205
- Jensen ON, Podtelejnikov AV, Mann M: *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4741-4750
- John JP, Anrather D, Pollak A, Lubec G: *Proteins.* **2006**, 64, 543-551
- Jones JJ, Borgmann S, Wilkins CL, O'Brien RM: *Anal Chem.* **2006**, 78, 3062-3071
- Josic D, Clifton JG: *Proteomics* **2007**, 7, 3010-3029
- Jungblut PR, Schlueter H: *Biospektrum* **2008**, 1, 37-40
- Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F: *Anal. Chem.* **1985**, 57, 2935-2939
- Karas M, Hillenkamp F: *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299-2301
- Karas M, Bahr U, Hillenkamp F: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1989**, 92, 231-242
- Karas M, Bahr U, Gießmann U: *Mass Spectrom Rev.* **1991**, 10, 335-357
- Karas M, Glückmann M, Schäfer J: *J Mass Spectrom.* **2000**, 35, 1-12
- Karas M, Krüger R: *Chem Rev.* **2003**, 103, 427-440
- Karty JA, Ireland MM, Brun YV, Reilly JP: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2002**, 782, 363-383
- Kaufmann R, Spengler B, Lützenkirchen F: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1993**, 7, 902-910
- Keshgegian AA, Peiffer P: *Clin Chim Acta.* **1981**, 110, 337-340
- Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP: *Methods.* **2005**, 35, 265-273
- Kislinger T, Cox B, Kannan A, Chung C, Hu P, Ignatchenko A, Scott MS, et al.: *Cell* **2006**, 125, 173-186
- Klose J: *Humangenetik* **1975**, 26, 231-243
- Kohn J: *Nature* **1957**, 180, 986-987
- Krause E, Wenschuh H, Jungblut PR: *Anal. Chem.* **1999**, 71, 4160-4165
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL: *J Mol Biol* **2001**, 305, 567-580
- Kyte J, Doolittle RF: *J Mol Biol.* **1982**, 157, 105-132
- Laemmli UK: *Nature* **1970**, 227, 680-685

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al: *Nature* **2001**, 409, 860-921
- Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, Eling WM, et al.: *Nature* **2002**, 419, 537-542
- Lawen A, Ly JD, Lane DJ, Zarschler K, Messina A, De Pinto V: *Int J Biochem Cell Biol.* **2005**, 37, 277-282
- Lazarev AV, Rejtar T, Dai S, Karger BL: *Electrophoresis* **2009**, 30, 966-973
- Leif H, Sled VD: *Eur. J. Biochem.* **1995**, 230, 538-548
- Lewin M, Guilhaus M, Wildgoose J, Hoyes J, Bateman B: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2002**, 16, 609-615
- Lilley KS, Razzaq A, Dupree P: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 46-50
- Link AJ, Eng J, Schieltz DM, Carmack E, Mize GJ, Morris DR, Garvik BM, et al.: *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 676-682
- Liu T, Belov ME, Jaitly N, Qian WJ, Smith RD: *Chem Rev.* **2007**, 107, 3621-3653
- Loo JA, Udseth HR, Smith RD: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 207-210
- López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Martínez-Bartolomé S, García-Ruiz P, Vázquez J: *Proteomics* **2006**, 6 Suppl 1, S4-11
- Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM: *Nat Biotechnol* **2007**, 25, 117-124
- Macek B, Waanders LF, Olsen JV, Mann M: *Mol Cell Proteom* **2006**, 5, 949-958
- Macfarlane RD, Torgerson DF: *Science* **1976**, 191, 920-925
- Macfarlane DE: *Anal Biochem* **1983**, 132, 231-235
- MacGillivray AJ, Rickwood D: *Eur J Biochem* **1974**, 41, 181-190
- Macher BA, Yen TY: *Mol. Biosyst.* **2007**, 3, 705-713
- Makarov A: *Anal Chem* **2000**, 72, 1156-1162
- Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Horning S: *Anal Chem* **2006**, 78, 2113-2120
- Mamyrin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA: *Sov Phys JETP* **1973**, 37, 45
- Manabe T, Ya J: *Electrophoresis* **2005**, 26, 257-267
- Mann M, Jensen ON: *Nature Biotechnology* **2003**, 21, 255-261
- Maurer HR: *Disc Electrophoresis*, De Gruyter, Berlin, **1971**
- McLafferty FW, Breuker K, Jin M, Han X, Infusini G, Jiang H, Kong X, et. al.: *FEBS J* **2007**, 274, 6256-6268
- Medzihradsky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL: *Anal. Chem.* **2000**, 72, 552-555
- Melton L: *Nature* **2004**, 429, 101-107
- Meng CK, Mann M, Fenn JB: *Z. Phys. D - Atoms, Molecules and Clusters* **1988**, 10, 361-368
- Moller S, Croning MD, Apweiler R: *Bioinformatics* **2001**, 17, 646-653
- Moore BW, Lee RH: *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 1359-1364
- Moritz RL, Simpson, RJ: *Nat. Methods* **2005**, 2, 863-873

- Morris HR, Paxton T, Dell A, Langhorne J, Berg M, Bordoli RS, Hoyes J et al.: *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **1996**, 10, 889-896
- Munson MSB, Field FH: *Journal of the American Chemical Society* **1966**, 88, 2621-2630
- Nesatyy VJ, Dacanay A, Kelly JF, Ross NW: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2002**, 16, 272-280
- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H: *Electrophoresis* **1985**, 6, 427-448
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W: *Electrophoresis* **1988**, 9, 255-262
- O'Connell PBH, Brady CJ: *Anal. Biochem.* **1976**, 76, 63-73
- Oda Y, Huang K, Cross FR, Cowburn D, Chait BT: *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**, 96, 6591-6596
- O'Farrell PH: *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 4007-4021
- Ohnishi T, Salerno JC: *FEBS Letters* **2005**, 579, 4555-4561
- Olsen JV, Ong SE, Mann M: *Mol Cell Proteomics* **2004**, 3, 608-614
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: *Mol Cell Proteomics* **2002**, 1, 376-386
- Opiteck GJ, Jorgenson JW: *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2283-2291
- Ornstein L: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1964**, 121, 321-349
- Ott CM, Lingappa VR: *J Cell Sci.* **2002**, 115, 2003-2009
- Ovchinnikov YA: *Photochem. Photobiol.* **1987**, 45, 909-914
- Pandey A, Mann M: *Nature* **2000**, 405, 837-846
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ: *Curr Biol.* **1993**, 3, 327-332
- Pappin DJ: *Methods Mol. Biol.* **1997**, 64, 165-173
- Patton WF: *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* **2002**, 771, 3-31
- Peng G, Fritzsche G, Zickermann V, Schägger H, Mentele R, Lottspeich F, Bostina M, et al.: *Biochemistry* **2003**, 42, 3032-3039
- Pereira Navaza A, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A: *Angew Chem Int Ed Engl.* **2007**, 46, 569-571
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS: *Electrophoresis* **1999**, 20, 3551-3567
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schägger H: *J. Biol.Chem.* **2003**, 278, 52873-52880
- Pitt-Rivers R, Impiombato FS: *Biochem J.* **1968**, 109, 825-830
- Piyadasa CK, Håkansson P, Ariyaratne TR: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1999**, 13, 620-624
- Price D, Milnes, GJ: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1990**, 99, 1-39
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M et al.: *Methods* **2001**, 24, 218-22
- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J: *Proteomics* **2001**, 1, 699-704
- Rabilloud T, Vaezzadeh AR, Potier N, Lelong C, Leize-Wagner E, Chevallet M: *Mass Spectrom Rev.* **2009**, 28, 816-843
- Rais I, Karas M, Schägger H: *Proteomics* **2004**, 4, 2567-2571
- Raymond S, Weintraub L: *Science* **1959**, 130, 711-712

- Ren H, Du N, Liu G, Hu HT, TianW, Deng ZP, Shi JS: *World J Gastroenterol* **2006**, 12, 2789–2792
- Renart J, Reiser J, Stark GR: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 3116-3120
- Richert S, Luche S, Chevallet M, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T: *Proteomics* **2004**, 4, 909-916
- Rietschel B, Arrey TN, Meyer B, Bornemann S, Schuerken M, Karas M, Poetsch A: *Mol Cell Proteomics* **2009**, 8, 1029-1043
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B: *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 1030-1032
- Righetti PG, Brost BC, Snyder RS: *J Biochem Biophys Methods.* **1981**, 4, 347-363
- Righetti PG: *J Biochem Biophys Methods.* **1989**, 19, 1-20
- Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E: *Electrophoresis* **2005a**, 26, 297-319
- Righetti PG: *J. Chromatogr. A.* **2005b**, 1079, 24-40
- Righetti PG, Boschetti E, Lomas L, Citterio A: *Proteomics* **2006**, 6, 3980-3992
- Roepstorff P, Fohlman J: *Biomed Mass Spectrom.* **1984**, 11, 601
- Ros A, Faupel M, Mees H, Oostrum J, Ferrigno R, Reymond F, Michel P, et al.: *Proteomics* **2002**, 2, 151-156
- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P: *Anal. Biochem.* **1992**, 203, 173-179
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, et al.: *Mol Cell Proteomics.* **2004**, 3, 1154-1169
- Rowen L, Mahairas G, Hood L: *Science* **1997**, 278, 605-607
- Sambrook** J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.), Cold Spring Harbor Press, **2001**
- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T: *Electrophoresis* **2000**, 21, 1054-1070
- Schägger H, Link TA, Engel WD, von Jagow G: *Methods Enzymol.* **1986**, 126, 224-237
- Schägger H, von Jagow G: *Anal. Biochem.* **1987**, 166, 368-379
- Schägger H, von Jagow G: *Anal. Biochem.* **1991**, 199, 223-231
- Schägger H, Cramer WA, von Jagow G: *Anal Biochem.* **1994**, 217, 220-230
- Schägger H, Brandt U, Gencic S, von Jagow G: *Methods Enzymol.* **1995**, 260, 82-96
- Schägger H: *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 16-22
- Scheele GA: *J Biol Chem.* **1975**, 250, 5375-5385
- Schlosser A, Pipkorn R, Bossemeyer D, Lehmann WD: *Anal Chem.* **2001**, 73, 170-176
- Schlosser A, Bodem J, Bossemeyer D, Grummt I, Lehmann WD: *Proteomics* **2002**, 2, 911-918
- Schluesener D, Fischer F, Kruip J, Rögner M, Poetsch A: *Proteomics* **2005**, 5, 1317-1330
- Schmelzer CEH, Schoeps R, Reynell L, Ulbrich-Hofmann R, Neubert RHH, Raith K: *J Chromatography A* **2007**, 1166, 108-115
- Schwass DE, Finley JW: *J. Agric. Food Chem.* **1984**, 32, 1377-1382
- Seelert H, Krause F: *Electrophoresis* **2008**, 29, 2617-2636
- Senko MW, Hendrickson CL, Emmett MR, Shi SDH, Marshall AG: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, 8, 970-796

- Senn M, McLafferty FW: *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1966**, 23, 381-385
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV: *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1967**, 28, 815-820
- Shen Y, Zhao R, Berger SJ, Anderson GA, Rodriguez N, Smith RD: *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4235-4249
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: *Anal Chem.* **1996**, 68, 850-858
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M: *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 2856-60
- Sidhu SS, Fairbrother WJ, Deshayes K: *Chembiochem* **2003**, 4, 14-25
- Simat TJ, Steinhart H: *J Agric Food Chem.* **1998**, 46, 490-498
- Simpson RJ, Conolly LM, Eddes JS, Pareira JJ, Moritz RL, Reid GE: *Electrophoresis*, **2000**, 21, 1707-1732
- Sitek B, Scheibe, B, Jung K, Schramm A, Stuehler K (Eds.): *Proteomics in Drug Research*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, 33-55
- Siuti N, Kelleher NL: *Nat Methods* **2007**, 4, 817-821
- Sleno L, Volmer DA, Marshall AG: *J Am Soc Mass Spectrom.* **2005**, 16, 183-198
- Smith RD, Loo JA, Barinaga CJ, Edmonds CG, Udseth HR: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, 1, 53-65
- Smithies O: *Biochem J.* **1955**, 61, 629-641
- Speers AE, Wu CC: *Chem Rev.* **2007**, 107, 3687-3714
- Speicher KD, Kolbas O, Harper S, Speicher DW: *J. Biomol. Tech.* **2000**, 11, 74-86
- Spengler B, Kirsch D, Kaufmann R, Jaeger E: *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1992**; 6, 105-108
- Stafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* **1984**, 60, 85-98
- Stellwagen NC: *Electrophoresis* **1998**, 19, 1542-1547
- Stellwagen NC: *Electrophoresis* **2009**, 30 Suppl 1, 188-195
- Stevens TJ, Arkin IT: *Protein Sci.* **2000**, 9, 505-511
- Stewart II, Thomson T, Figeys D: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, 15, 2456-2465
- Strupat K, Karas M, Hillenkamp F: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1991**, 111, 89-102
- Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A: *Anal Bioanal Chem.* **2003**, 376, 952-965
- Switzer RC 3rd, Merrill CR, Shifrin S: *Anal Biochem.* **1979**, 98, 231-237
- Syka JEP, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF: *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**, 101, 9528-9533
- Takach** EJ, Hines WM, Patterson DH, Juhasz P, Falick AM, Vestal ML, Martin SA: *J Protein Chem.* **1997**, 16, 363-369
- Takahashi K: Pepsin A, *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2nd Ed, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **2004**
- Tan S, Tan HT, Chung MCM: *Proteomics* **2008**, 8, 3924-3932
- Taranenko NI, Tang K, Allman SL, Chang LY, Chen CH: *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 1001-1006
- Tas J, de Vries AC, Berndsen RG: *Anal Biochem.* **1979**, 100, 264-270
- Tastet C, Lescuyer P, Diemer H, Luche S, van Dorsselaer A, Rabilloud T: *Electrophoresis* **2003**, 24, 1787-1794

- Taylor GI: *Proc. Royal Soc. Lond.* **1964**, 280, 383-397
- Thiede B, Lamer S, Mattow J, Siejak F, Dimmler C, Rudel T, Jungblut PR: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 496-502
- Thomson JJ: *Phil Mag* **1897**, 44, 293
- Tiselius A: *Trans. Faraday Soc.* **1937**, **33**, 524-530
- Torres J, Stevens, TJ, Samsó M: *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 137-144
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 4350-4354
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, et al.: *Nature* **2000**, 403, 623-627
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS: *Electrophoresis* **1997**, 18, 2071-2077
- Van Ulsen P, Kuhn K, Prinz T, Legner H, Schmid P, Baumann C, Tommassen J: *Proteomics* **2009**, 9, 1771-1781
- Vastola FJ, Pirone AJ: *Adv. Mass Spectrom.* **1968**, 4, 107-111
- Venter JC, Adams M.D, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith, HO, et al.: *Science* **2001**, 291, 1304-51
- Vercauteren FG, Arckens L, Quirion R: *Amino Acids* **2007**, 33, 405-414
- Vestal ML, Juhasz P, Martin SA: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, 9, 1044-1050
- Vidal M, Legrain P: *Nucleic Acids Res* **1999**, 27, 919-929
- Viswanathan S, Unlu M, Minden JS: *Nat. Protoc* **2006**, 1, 1351-1358
- Von Klobusitzky D, Köning P: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. Naunyn-Schmiedeberg's* **1939**, 192, 271-275
- Voris BP, Young DA: *Anal Biochem* **1980**, 104, 478-484
- Vorm O, Roepstorff P, Mann M: *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3281-3287
- Wang W, Guo T, Rudnick PA, Song T, Li J, Zhuang Z, Zheng W, et al.: *Anal Chem.* **2007**, 79, 1002-1009
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR III: *Nat Biotechnol.* **2001**, 19, 242-247
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Potjak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, et al.: *Electrophoresis* **1995**, 16, 1090-1094
- Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB: *Anal Chem.* **1985**, 57, 675-679
- Whittall RM, Li L: *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1950-1954
- Wieland T, Fischer E: *Naturwissenschaften* **1948**, 35, 29-30
- Wiener MC, Sachs JR, Deyanova EG, Yates NA: *Anal Chem.* **2004**, 76, 6085-6096
- Wiley WC, McLaren IH: *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, 1150-1157
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1996**, 13, 19-50
- Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF: *Electrophoresis* **1998**, 19, 1501-1505
- Wilm M, Mann M: *Anal Chem.* **1996**, 68, 1-8
- Winkler HU, Beckey HD: *Biochem Biophys Res Commun.* **1972**, 46, 391-398
- Winkler C, Denker K, Wortelkamp S, Sickmann A: *Electrophoresis* **2007**, 28, 2095-2099

- Wittig I, Schägger H: *Proteomics* **2005**, 5, 4338-4346
- Wittig I, Braun HP, Schägger H: *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 418-28
- Wittig I, Karas M, Schägger H: *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, 6, 1215-1225
- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR III: *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5683-5690
- Yagi** T, Matsuno-Yagi A: *Biochemistry* **2003**, 42, 2266-2274
- Yamashita M, Fenn JB: *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4451-4459
- Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C: *Anal Chem.* **2001**, 73, 2836-2842
- Yates JR III, Speicher S, Griffin PR, Hunkapiller T: *Anal.Biochem.* **1993**, 214, 397-408
- Yates JR III, Cociorva D, Liao L, Zabrouskov V: *Anal Chem* **2006**, 78, 493-500
- Yergey AL, Coorssen JR, Backlund PS Jr, Blank PS, Humphrey GA, Zimmerberg J, Campbell JM, et al.: *J Am Soc Mass Spectrom.* **2002**, 13, 784-791
- Yocum AK, Yu K, Oe T, Blair IA: *J Proteome Res* **2005**, 4, 1722-1731
- Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T: *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2001**, 2, 669-677
- Yuan X, Kuramitsu Y, Furumoto H, Zhang X, Hayashi E, Fujimoto M, Nakamura K: *Electrophoresis* **2007**, 28, 2018-2026
- Zabrouskov** V, Whitelegge JP: *J Proteome Res* **2007**, 6, 2205-2210
- Zhang HM, Kazazic S, Schaub TM, Tipton JD, Emmett MR, Marshall AG: *Anal Chem* **2008**, 80, 9034-9041
- Zhou C, Zheng Y, Zhou Y: *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **2004**, 2, 1-5
- Zhou J, Ens W, Standing KG, Verentchikov A: *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **1992**, 6, 671-678
- Zhou M, Veenstra T: *Biotechniques* **2008**, 44, 667-668
- Zubarev RA, Hakansson P, Sundqvist B: *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4060-4063
- Zubarev RA, Kelleher NL, McLafferty FW: *J Am Chem Soc* **1998**, 120, 3265-3266

8. Abkürzungsverzeichnis

Dieses Kapitel enthält eine Auflistung aller in dieser Dissertation verwendeten Abkürzungen und Akronyme. Nicht gesondert aufgeführt sind sämtliche Einheiten und Präfixe des *Système international d'unités* (SI) und die Symbole und Nomenklatur chemischer Formeln nach *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

16-BAC	16-Benzyltrimethyl- <i>n</i> -Hexadecylammoniumchlorid
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
A	Alanin
AA	Aminosäure
ACN	Acetonitril
ADH	Alkoholdehydrogenase
Ambic	Ammoniumhydrogencarbonat
AMY	Alpha-Amylase
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BAC	<i>N,N'</i> -Bisacryloylcystamin
BN	Blau-nativ
BR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cystein
C-trap	<i>Curved trap</i>
CAH	Carboanhydrase
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue G250</i>
RP18	C18-Umkehrphase
CHAPS	3-Chloramidopropyl-Dimethylammonio-1-Propansulfat
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxycinnamssäure
CI	Chemische Ionisation
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation

CIEF	Kapillar- isoelektrische Fokussierung
CN	Klar-nativ
CNBr	Bromcyan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
D	Asparaginsäure/Aspartat
Da	Dalton
DATD	<i>N,N'</i> -Diallyltartardiamid
DE	<i>Delayed extraction</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DHEBA	<i>N,N'</i> -1,2-Dihydroxyethylenbisacrylamid
DIGE	<i>Differential gel electrophoresis</i>
dSDS	Doppel-SDS
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Glutaminsäure/Glutamat
EDA	Ethylenglykoldiacrylat
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation
F	Phenylalanin
FA	Ameisensäure
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
FDI	Felddesorptions-Ionisation
FFE	<i>Free flow electrophoresis</i>
FTICR	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz
G	Glycin
GRAVY	<i>Grand Average of Hydropathy</i>
H	Histidin
HCD	<i>Higher Energy Collisional Dissociation</i>
HDX	Wasserstoff/Deuterium-Austausch
HGP	Human-Genom-Projekt
HSA	humanes Serumalbumin
I	Isoleucin

IAA	<i>N</i> -Iodacetamid
ICAT	<i>Isotope Coded Affinity Tag</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	immobilisierten pH-Gradienten
IT	Ionenfalle
iTRAQ	<i>Isobaric Tag for relative and absolute Quantitation</i>
K	Lysin
L	Leucin
LC/HPLC	Flüssigchromatographie
LDI	Laserdesorption/Ionisation
LIT	Lineare Ionenfalle
M	Methionin
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
MBA	<i>N,N</i> -Methylenbisacrylamid
MBE	<i>Moving boundary electrophoresis</i>
MCP	Multikanalplatte
MGF	<i>Mascot Generic File</i>
MOWSE	<i>Molecular Weight Score</i>
MS	Massenspektrometrie
MudPIT	Multidimensionale Proteinidentifikations-Technologie
N	Asparagin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NL	nicht linear
OGE	<i>Off-gel</i> -Isoelektrische Fokussierung
oTOF	orthogonaler Flugzeitmassenanalysator
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDI	Plasmadesorption-Ionisation
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>

ppm	<i>parts per million</i>
PSD	<i>Post Source Decay</i>
PTM	posttranslationale Modifikationen
Q	Glutamin
Q	Quadrupol
QIT	Quadrupol-Ionenfalle
QqQ	<i>Triple Quadrupol</i> -Massenanalysator
R	Arginin
RuPBS	Ruthenium-Bathophenanthrolindisulfonat
S	Serin
S/N	Signal-zu-Rauschverhältnis
SCX	starke Kationenaustausch-Chromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEV	Sekundärelektronen-Vervielfacher
SILAC	<i>Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture</i>
T	Threonin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	<i>Timed Ion Selector</i>
TMT	<i>Tandem Mass Tag</i>
TOF	Flugzeitmassenanalysator
TRIS	2-Amino-2-(Hydoxymethyl)-Propan-1,3-Diol
UV	ultraviolett
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

9. Anhang

9.1 Komplex I

9.1.1 Homologie der einzelnen Untereinheiten

NuoA1	1	MREMEYVWILVFAGILLVIGLVMISLNALLGPREPQIYEDYPYECGVPLYDKDAQTTFHQ
NuoA2	1	---MEYIALGIGLLVALLIALGQAFVNDILGTRKRDPLEDYPYECGVPLYDPEARCTFKQ
NuoA1	61	GYLLGLLLILFDIEAFLFPWSVYRYLGVFGFIEMFIFIFILTYGLIYAWKKGALDWQ
NuoA2	58	GYLLGLLLILFDIEAAYLFPWAVVFEEIGIYGLIEVIVFVGILTLGFIYAWRKGALNWE
NuoA1	121	FEIEEV
NuoA2	118	M-----
NuoD1	1	MPWAKEGDIQELLKAFP-QASVVELQNSTSVIVPKDILIDVLKYLKEKLGKLELDHSSVV
NuoD2	1	MKWVNKGTVVERVKQEFKDEVKYYETKHTKGFEVSHDFLKPLILKFLKERERELHFEVDMTCI
NuoD1	60	DLKDLENEKEFNKVVQNLIAPFEDRESRFQAFYILYNVDERKRVIVKTRTN-GKLPTI
NuoD2	61	D-----FPEHPN-RFQGVYILYNPEENERVIVKSWAKDGKLPTV
NuoD1	119	EKLWFAGKWAERECYDMFGIEYEGHENLVRAFMDTYPYFPLRKDFPLEGIPEQELPSLN
NuoD2	99	EDLWPGAKWAEREAYDMFGVVEGHEENLRRMFMEGYEHYPLRKDFPLQGIPEVELPSIT
NuoD1	179	EVVFGDNLEGLMNYDRMHTRVPTLEDLEVTEKKRLKKKAQIVLNWGPLHPGTHGTMWFLF
NuoD2	159	EVLHGRTDPPSHDFELVHTKLPTLEDLERTEKARLKKKAELVLNWGPLHPGTHGTIWFLF
NuoD1	239	DLEGERIVQTDVILGQLHRGVEKLAHEHEMYNQFIVYTDMDYLSALCSNQAWVVAIERLM
NuoD2	219	DLEGEKVVSQSDVILGQLHRGMEKLAENLHYFQFIPYTDMDYISAICNELAYVETVERLL
NuoD1	299	GIHDKVPPKAKYIRTMMSELQRINSHLLWLGTYALDLGALTIFLYAFKEREKIMDIIEGI
NuoD2	279	GV--EVPEKARYIRTMFAELQRINSHLLWLGTGALDLGALTIVFLYAFREREKIMDIIEGN
NuoD1	359	TCARLTISYPRIGGVMDLPEGALVIAKAFIKKFPEELKDWETILTRNRIWLRRNKEVGI
NuoD2	337	AGYRLTSCFLRIGGVHYDLAEGTLDVVKHFIKDFPNRLKEYHTLLTRNRIWLRRTKDVGV
NuoD1	419	ISKEDAYFHGVTGPVIRGSGIPYDIRKFEPYDAYDEVEFDIPVGEIGDCYDRYLVRMEEM
NuoD2	397	ITREDVHNYGLSGPVARGSGVPYDLRKLQPYAAYDEVEFDIPVGEVGDVYDRYLVRMEEM

NuoD1	479	KQSIIRIIEQCVAKLEKMSKNEP-----FFEYEGEGKKLKLSIDGIGVKAPV
NuoD2	457	AQSVRIIEQCVQKLEKLPKDAPYLNKEHPAVIPPKEDVEHDLSESMVKSFRVVVHGEDAPP
NuoD1	524	GEIYSSGENPRGELGFYVYSTGGTSPYRVKIRPPSYNLCIYPHLMKDRYVADAVTILAS
NuoD2	517	GEVYFAGENPRGELGFFIYKGGGKPYRTRIRSGALYNLSIFPKLIQGRTIADATALLGS
NuoD1	584	IDPVVGETDR
NuoD2	577	LDPVVGETDR
NuoH1	1	MEAIAYSIAFTFLKIVIVFSLALGIGAYLTWFERKLAGHIQNRLGPTVVGKFGILQPLAD
NuoH2	1	MHSFWINLLFAVIKIVILLIALGIGAFLTWERKVAHIQRRPGPMVVGWHGILQPLAN
NuoH3	1	-----
NuoH1	61	ALKLATKEVIIIPRGADKPVYYAAVVMALVPSILLTLTIIPFGPGFRVGNTRYIEPIIADVNI
NuoH2	61	GLKLLTKEDLFPRYGDKFLYHLAIIILALVPATLVFSVVPFGPEFEVFGYKVKPILSDVNV
NuoH3	1	-----MVHRSITLSATIAV-----
NuoH1	121	ALLIAFAFGSLSVYGTIFSGWASNSKYAFIGSLRKAADVIAEYEVVLGESVLGVILLAGTL
NuoH2	121	GLLLVFALGSMVYAVALAGWASNSKYPLIASMRKAGVLVSIEYEVVITFAVMGPIMLAGTL
NuoH3	14	----VLFFGGWSPINIPFVGFDVP----LFFLGPLSPFVWEILKTALFLFILWLHWTL
NuoH1	181	STVGIVEAQIQKGVWFIFYQPVAFIFYLFCMLAESGRVPFDIQEAEAEELVTGYNVEYGGM
NuoH2	181	STYEIVQKQIEQNLWYIIVQPIAFVVMFAALAEMGRVPFDVQEAEAEELVTGETVEYGGM
NuoH3	65	PRYRID--QITQNAWKIMLPLTLFNIVLTAVLAPIVWR-----
NuoH1	241	KFGAFPLAEWYVNVIALSAIAVVLFEGGWDGPHIFGPLSPYFWFVKTFALVFFTLWLHW
NuoH2	241	KFGLFPLVEWYIEVLPCLL-----
NuoH3		-----
NuoH1	301	TLPRFQAKDITEIAWKILLPIAILNVIITAVVVYAF
NuoH2		-----
NuoH3		-----

NuoI1	1	MGVKKLSRKDYLNILESILFIDFLKGLSVTLKNLLRRPITTEYPKEKITPPKRFRGAHGH
NuoI2	1	-MIKKVAAKP-LSWLERIFFIDFIKGLRITLKNALRKTIITTHYPYEKITPPKRFRGYFAH
NuoI1	61	YVWDGTEPD--SLKAIEKF-MSYEKAKSRCVACYMCQTACPMPTLFRIEAVQLPNGKKKV
NuoI2	59	KVVDGTEPQPAFQEWVNRYNILVEYGKSRCSVCLRCCKRACVPVQLFETEGKKLPNGKRVV
NuoI1	118	VRFDNNLLNCLFCGLCVDACPVGCLTMTDIFELANYSRNEVLRMEDLEKFAIDKQRRG
NuoI2	119	SVFNNMMLLCTYCGFCVDACVPDCLYQTDIHENASYTRKDAVLTLEILEQICRDWQRRRE
NuoI1	178	NEPDRIWPNDEEREKLWG--KIEWSG----
NuoI2	179	REPDRIWIDDEORMKLWGENNPKLPKPEEV
NuoJ1	1	-MEWLIFF-ILGAWLIISALGTVLAKNPIHVMLEFFLSLLAMAGLFLSLGAELLAGLQLI
NuoJ2	1	MMGRLLIFGFFSILAILSGIGIITLRNPVYVVVALLSLLIAGVAGIFFTAGAELVGALQLL
NuoJ1	59	IYAVAIIVFYVLAITTIPEWIKRFEQVYKTEILTASPIILLVFLVMSYVVIKGFABPS
NuoJ2	61	IYAVATAVFYIIVISAVPWEKAKKSESHYRFEGILSLPVVFLFYIEMIVVFLIGVKASPE
NuoJ1	119	GVVK-----DNVEAVGRTLFTSYLFPFEVASVILLVAMVGAILLARKEE-----
NuoJ2	121	GKIAKFIEKFGNTEVIGAILFSKYFLAFEVVSIVLLMGMIGAVLIGRKESQTYEDDTA
NuoK1	1	MDIT--KAYIILSIALFLIGLIGVIVRKNLITVLVSTELMLNGINIALVAADKVLGRVDG
NuoK2	1	MKTIPLEAFLTVSMILFGLIGLIGIARRNLVTVLMSLELALNAVNIALVGADHYLGLAEG
NuoK1	59	QIFAFFVLTVAAAEVAVGLGLIVAIFRLKGYEASHEISQLRD
NuoK2	61	QIFALFIIALAATEAAVGLGIIIAIFRLKKVESTDEIRELRG
NuoL1	1	MSMMVELGVIFTPLIAFLIILLFGRKIGDLGSGIIASVGAGLTTLFSLVVALKAIHSPVH
NuoL3	1	---MEGLFVIFTPLIAFLIILAFGRKIGDLGSGIIASVGAGLTTLFSLVVALKAIHSPIH
NuoL2	1	MOYMIILPILLQLVSAFLVYRLNRLVG-----ARLSTSFILTNFLISILLT
NuoL1	61	VKLYDFLPIGNYTLISLGFYFDSLSSLMALVVTFFVATLIFVYSIGYMRDEFGKWVFKFYAY
NuoL3	58	VKLYDFLPIGNYTLISLGFYFDSLSSLMALVVTFFVATLIFVYSIGYMRDEFGKWVFKFYAY
NuoL2	50	GSFGHFSLFG----VLELFPDRIGLLSTYILLVSSVIHKYAENYMRDEPG--YRRFYAL
NuoL1	121	LSLFLFAMLLIVLSDNLLGIFFGWEGVGLASYLLIGYYHEQKKATKASFEAFVMNRIGDW
NuoL3	118	LSLFLFAMLLIVLSDNLLGIFFGWEGVGLASYLLIGYYHEQKKATKASFEAFVMNRIGDW
NuoL2	104	LDLMTATLILIVVAGNLLILFFAWHLVGVLLFLLLNHNRYREEKAVRFANLSFITQRLADV

NuoL1	181	LFIFGIIYSFYLFKLTLEITQIFPKVEEVD--KYALGVATMLLFGGAVGKSGQFPLHTWLP
NuoL3	178	LFIFGIIYSFYLFKLTLEITQIFPKVEEVD--KYALGVATMLLFGGAVGKSGQFPLHTWLP
NuoL2	164	PLLIATIVLLYLEFRTLSIPELEKAVLSFEGYSFTLWVPLLVMSAMIKSAQVPEHLWLIV
NuoL1	239	NAMAGPTPVSAALLHAATMVAAGVYMVARLYPMFEATPQTLKLIVLIGAITMTMAALAGAV
NuoL3	236	NAMAGPTPVSAALLHAATMVAAGVYMVARLYPMFEATPQTLKLIVLIGAITMTMAALAGAV
NuoL2	224	YSMEGPTPVSAALMHAG-IVNAGAFVLRNRTAFLEFTHENPGIYLAFFVGSITAILGSALMLTI
NuoL1	299	HNDIKKIIAFSTMSQLGYMFVALGVGDGKGAMFHLTTHAFFKALLFLAAGAVITAFHHH-
NuoL3	296	HNDIKKIIAFSTMSQLGYMFVALGVGDGKGAMFHLTTHAFFKALLFLAAGAVITAFHHH-
NuoL2	283	QNDVKKSLGYSTVGQMGYVMVEFGIGAFALAVYHMAHGIFKATLFLYSQNVLSARKDP
NuoL1	358	-----LYDIFKMGG-----LKKYMPVTY
NuoL3	355	-----LYDIFKMGG-----LKKYMPVTY
NuoL2	343	NIPEDEVYKVVTRGIKFEKNVPWLLYALLSILVPLLLVVLIIHLIVEEHFLEYETQLIIFF
NuoL1	376	VAFMIGALSLAGVFPFSG-----FWSKDRIVASM
NuoL3	373	VAFMIGALSLAGVFPFSG-----FWSKDRIVASM
NuoL2	403	FAWATGAQAVISTERTEREKPLLSALIAILSLLIFLLGYVVMGHITLSKFLYPNQEIITERT
NuoL1	405	YEWSC-----VLGVLTIVAFITAYYAFREGFLVFHG--RERWREIYDKDVHEV
NuoL3	402	YEWSC-----VLGVLTIVAFITAYYAFREGFLVFHG--RERWREIYDKDVHEV
NuoL2	463	YESSFANTVVLIAEMILIGLIIILAGWVFIYYANKEKELTENTFVYTHLSRELTYFTDIYEF
NuoL1	452	EGVMTVPMGLLG-----FLTTLTGLFGLWLEHWYVGLIG
NuoL3	449	EGVMTVPMGLLG-----FLTTLTGLFGLWLEHWYVGLIG
NuoL2	523	IKEFLKVSDDLKKEVSFAGISLFALFLLALELSTADFKTLTLLGLFIPLIPSVYTLIKL
NuoL1	486	GEEKGIHLSVALVS-----LGVAIAGIWLWPVYVKKVIDYNKAYESLKFIHTTFKEQ
NuoL3	483	GEEKGIHLSVALVS-----LGVAIAGIWLAWAVYVKEVIDYNKAYESLKFIHTTFKEQ
NuoL2	583	KGNPYTYSVLLIGSLLGVVFFGEISLSPLVPLITEAFFSLRSLSSRNLSFIPDIEGAS
NuoL1	539	FFTEKLYHNVVAGGYLTYSRSLYSTVERLFIDGIVNATYP-----IVEL
NuoL3	536	FFTEKLYHNVVAGGYLVVSRVAYKVGDRTVIDGFINALYKYFFKFVKFLWKYLDIKIIDV
NuoL2	643	ASVLWISSKFWLGIFVAFGILILVYLGEFLRKYYGSSEFGFITGLIEKAPKESALTFTITA
NuoL1	583	LG-----SVLKFFQNGRLS-----WYVMGLATGLTIIIVLILFAITIRGGL---
NuoL3	596	LIHE-----TVLTAFRLGRLSRRLQTGLVNHYILFLAVGLTFILGIMLYILDR--L---
NuoL2	703	LFYLGAPLFITFYAYYYAGIELNLYTYALFLIGWVILSTAILVSLGKFLFYREREDLIYT
NuoL1/3		-----
NuoL2	763	DLDDRVFKPALGILVLLLVIGFFIA

NuoM1	1	ME TL -----LNVAIFLPLVGALLVAVIRNEIFAKVASILIGAVVALISLVLFVNEDESK
NuoM2	1	MEKVGFEFP II SVSLAIPAVFAVLILFFK-EKFAKYIALIGTGLTFLVSLIALFKFDFAR
NuoM1	55	K-GFQFETYVPWIKTLGIGYHVGVDGMAISLILMTSILFLAAYIWSW---KIEDRPSLYF
NuoM2	60	DNVIOFYEEYTILKELGVKLSLGMDGLSLIMYFLTTLVSLIAVIWSIGDEKIKHRLKEYY
NuoM1	111	ALFLALETACIGVFAALDLFLFYLFWEGMLIPMYFIIGFWGHDRKVYAANKFFLYTEFGS
NuoM2	120	IAFLLTESFVIGVFTTFNLLIVFYVFYELTLLPMLFVIGIWGYKLRLYSAYKFFVYIEISS
NuoM1	171	LFLLLGIASILVGYFETGKISFDYFFHLGLDYPLWLELIAFLLEFGIGFAVKIPMWPFHT
NuoM2	180	LFLLLGIASISTYHYKMNGSFTFEYLELLNLNIPNGFEIFLFLLEFLIAFAVKTPIVPFHT
NuoM1	231	WLPDAHVEAPTAGSVILAGVLLKMGTYGFVRFSIPFFEPEASKYYIPLIFTLSVVAVIYAA
NuoM2	240	WLPDAHGEAPTAGSVVLAAILLKMGTYALVRFNIGLFPDAALELSPYLVALGIYSIIMAS
NuoM1	291	MMATIAQTHMKRLIAYSSISHMGLVTLGTfamNSDALNGATYLMIAHGLSSAALFLCAGFI
NuoM2	300	WMTISQTNIKRFVAYSSVSHMGFVVTA AFLINMEGLRASIIEMFAHGLTSAGLFMVAGYI
NuoM1	351	YDRIHSYHMDDIGGLARYIPYFTFAFFLAVLAGIAFPGFASFVSEFILLLGIFEKFPVWA
NuoM2	360	YNKLHTFNFASLRGAIKFMPLFATITAATAFAAMGLPGGSFVGKFLTILAAREYSTPLA
NuoM1	411	FVAGIGMVLGAAYS LY MFRKVMLEESIP EE RV EE KWK KL DKDELHHAIP EE ALII IG MA LV M
NuoM2	420	FLVVF AA FFSAAYVLYFLK TI LYLD---V REE ---SVLIHFKDVSGYPLVAELMIVIPVLLV
NuoM1	471	GIYPYPF-----VKIVEHTSKLVFEGG
NuoM2	475	GFV PF IFFAFYNEFLVHLLKYVLKL PF --

NuoN1 1 -----MNWNAILPEAILAIGILTVFILELEFLERKHYKFLSVLAIFIVVLSGYS
 NuoN2 1 MDLRALIGVIEIPDLKKFLPEFIILLILAFILFTLELFIKGKERRLVLNVVSVVGYSVLM

NuoN1 49 IFFVN--YPAKLFFDGFSVDALNLIGKLEFILAVTGFVLLSSYDYFSKKNSQYGELPYLYL
 NuoN2 61 SLLIPWMYKGDTFYGNFTNDPLAVTVKIFAVLITLAILPFASSYFSAKKSFYGEFYLLA

NuoN1 107 IATLGLMVMISSDNLAIIFTGLELASITMYILVGLFRREYLSKEGAFKYLVI GTTGTSMY
 NuoN2 121 FTLLGVFVLA STYNLIILYVALELVSVGFYILTALLRGSTEAKGAFKYLILGGLSIALA

NuoN1 167 ALGSALVYASSGSMVLSPVK----EENTLFALGVILITISALALKVSAPVFHFVTPDAYEG
 NuoN2 181 SYCAAFMYIYSGSLDLREILTYQKDIHYLVGLVFFLIGLAVKIGAVPFHYWVPDAYQG

NuoN1 223 APTPTTAYLSTV PKIGMYFLFVKL TMYLFSAFP-DWKYVVMILAVLSM FYGNIVAYAOKS
 NuoN2 241 APTPV TALMASVGKLAFFIPLVRV MPLVQEKFSLVW TITVGVIAAL TMLYGNLVALVQKD

NuoN1 282 VKRLLEYSSIAHAGYFLTALTAVDKHLFSALLFYVFVYALATVGAF TVLAIL EKKEGWTH
 NuoN2 301 VKRLLEYSSIAHSGYIMAGA AVAKVIGMKAVIYFLVAYAVMSAGAF LV LALMEKNPEWQON

NuoN1 342 HFLDFKGLKEENPV LASMLALFLFALIGIPPAAVFLGKLG IFFGLVKTDMEALGILFATA
 NuoN2 361 YMENFYGLRFNAPYIAFAFFVYMVALLGVPPTVGFV GKALVFMA LSFDKLW WLAFLMILS

NuoN1 402 SLISAGYYLKVIVYMF LYSGEVRHGOTTVSAGEAFTVLGTAF LV IFFGLFPHVVLDFILR
 NuoN2 421 AAISTGY YIRLVVVMYMH EREKEIRSAPSHLGEKFSIFALT LASVLLGVLP SILVWFLIKQ

NuoN1 462 ALS-----
 NuoN2 481 SAENLFTG

9.1.2 Trypsinschnittstellen und Transmembranhelices

Nuo A1, Acc.No. O67392, 126 AA, Mr 14833 Da, 3 TMH

MREMEYVWILVFAGILLVIGLVMISLNALLGPREPQIYEDYPYECGVPLYDKDAQTTFHQGYLLGL
LLLLFDIEAAFLFPWSVVYRYLGVFGFIEMFIFILTYGLLYAWKKGALDWQFEIEEV

Nuo A2, Acc.No. O67333, 118 AA, Mr 13328 Da, 3 TMH

MEYIALGIGLLVALLIALGQAFVNDILGTRKRDPLEDYPYECGVPLYDPEARGTFKQGYLLGLLLIL
FDIEAAYLFPWAVVFEEIGIYGLIEVIVFVGILTLGFIYAWRKALNWEM

Nuo B, Acc. No. O67334, 179 AA, Mr 19880 Da, 3 TMH

MVAINSNGFVTTTVEELLRWGRRNSLWPVTIGLACCAIEMMHTAASRFDLDRLGVIFRASPRQADV
LIVAGTVVNKVAPMLKLIWDQMPDPKWCISMGGCASAGGPFTYSTLQGVDRIPVDVYIPGCPPTL
QGLIYGILQLQRKIKEQGITKYDKLFADFNREIEKEGIFVPRELKV

Nuo D1, Acc.No. O66826, 593 AA, Mr 68691 Da, 1 TMH

MPWAKEGDLQELLKAFPQASVVELQNSTSVIVPKDILIDVLKYLKEKLGKFLDHSVVDLKDLLE
NEKEFNKVVKQNLIAPEDRESRFQAFYILYNVDERKRVIVKTRTNGKLPTIEKLWFAGKWAERECY
DMFGIEYEGHENLVRAFMWDTYPYFPLRKDFPLEGPEQELPSLNEVVFGDNLEGLMNYDRMHTRV
PTLEDLEVTEKKRLKKKAQIVLNWGPLHPGTHGTMWFLFDLEGERIVQTDVILGQLHRGVEKLAEH
EMYNQFLVYTDRMDYLSALCSNQAWVVAIERLMGIHDKVPPKAKYIRTMMSSELQRINSHLLWLGT
YALDLGALTIFLYAFKEREKIMDIEGITGARLTISYPRIGGV RMDLPEGALEVIKAFKKFPEELKDW
ETILTRNRIWLRRNKEVGIISKEDAYFHGVTGPVIRGSGIPYDIRKFEPYDAYDEVEFDIPVGEIGDCY
DRYLVRIEMKQSIRIIEQCVAKLEKMSKNEPFFYELEGKKLKLSDGIGVKAPVGEIYSSGENPRGE
LGFYVVSTGGTSPYRVKIRPPSYYNLCIYPHLMKDRYVADAVTILASIDPVVGETDR

Nuo D2, Acc.No. O67335, 586 AA, Mr 67893 Da, 2 TMH

MKWNKGTVERVKQEFKDEVKYYETKHTKGFEVSHDFLKPLLKFLKERERFLHFVDMTCIDFPEHP
 NRFQGVYILYNPEENERVIVKSWAKDGKLPTEVDLWPGAKWAEREAYDMFGVVFEGHENLRMF
 MWEGYEHYPLRKDFPLQGIPEVELPSLTEVLHGRTDPPSHDFELVHTKLPTLEDLTERTEKARLKKKA
 ELVLNWGPLHPGTHGTIWFLFDLEGEKVVQSDVILGQLHRGMEKLAENLHYFQFIPYTD RMDYISAI
 CNELAYVETVERLLGVEVPEKARYIRTMFAELQRINSHLLWLGTGALDLGALT VFLYAFREREKIM
 DIIEGNAGYRLTSCFLRIGGVHYDLAEGTLDVVKHFIKDFPNRLKEYHTLLTRNRIWLRRTKDVGVIT
 REDVHNYGLSGPVARGSGVPYDLRKLQPYAAYDEVEFDIPVGEVGDVYDRYLVRMEEMAQSVRII
 EQCVQKLEKLPKDAPYLNKEHPAVIPPKEDEVFHDLESMVKSFRRVVHGEDAPPGEVYFAGENPRGE
 LGFFIYSKGGGKPYRTRIRSGALYNLSIFPKLIQGR TIADAIALLGSLDPVVGETDR

Nuo E, Acc.No. O66842, 160 AA, Mr 18551 Da, 0 TMH

MFKTEFEFPEELKTKLQEHINYFPKKRQAILLCLHEIQNYGYIPPESLKPLADMLELPLNHVEGVVA
 FYDMFDRERKAKYRIRVCVSIVCHLMGTNKKLKALENILGIKPGEVTPDGKFKIVPVQCLGACSEAP
 VFMVNDDEYKFESEVQLNEILSRYT

Nuo F, Acc.No. O66841, 426 AA, Mr 47508 Da, 1 TMH

MRSYPAIPRIYAETTLNMLLKRAKKPRVHSDIEYLKDGGYQALEKALNMSPEEIIDWVDKSTLRGRG
 GAGFPTGKKWKFAVQNPGRYFICNADESEPGTFKDRIIERDPHLLIEGHISSYAIGANEAYIYIRGEY
 PAGYYILRDAIEEAKKKGFLGKNILGSGFDLEIYVARGAGAYICGEETALIESLEGKRGHPRLKPPYP
 VQKGLWGKPTVVNNVETIANVPFIISMGWEEYRYIGPSDYAGPKLFPVSGKVKKPGVYELPMNTTL
 REVIFKYAGGTLGNKKVKAVFSGALDCFSSEELDIPMDYSPLGFGGTGTVIVLTEEDDIVEAALKIAE
 FYEHETCGQCTPCRVCYEQANLLEKIYKGEATEQDWEGFDFVNRNIQPTSICGLGAVAGRLIRQTL
 EKFPPEWEKYRKKKSASLPL

Nuo G, Acc.No. O66748,632 AA, Mr 72777 Da, 2 TMH

MSEKVKIYIDDVEIEAEKGKTVLQVALENGIDIPYFCYHPRLSIAGACRMCVVYWEDINRLVISCNLP
VQEGMRVRTHRTSEMVREQQKYLLQALMTRHPLDCPICDKAGECDLQNLGAIYGPQKQIVPISALE
KEREHDWESDFLEYYSNRCVVCYRCTRACDEVVGTRALYVEDRGFHSNIVPAVRPMDTSTCEMC
GICVHVCPVGAISKPFKYWSRSWLLEKGRTVCNLCPVGCEIQIEYGVGDWRSKRKVYRTKPTDELN
ICAKGFFGYDSINHKRLLKTKVKGREETPGNVVNLLTTILTEHGGKTGIVFSAYLPKEVIDEVLRIAK
ASQAYVTAPQSVDLFKFLDELEEYDFPTVKEFEKADAFVFIGDDITSVATVLSYYTKKKVYKIGKSV
RDEKLQPEEITYEDLQNLGNVFLVTPHALNGEIKEVATKLKELKREKGFKVIPVPKDANALYLYE
VLKGIYSDLPVMEACERGDIENLIIFGEDILEFYEDKVFEELKEKLEHLVVSPYEDGLSEYAHIKIP
MSLMGENEGTYKTFFGEVKGKKFLPWAFFDDLAFWKYLGENFKEEKGLKVVKSSSNLRRRFEPHLY
RNNWITQRSQNLSRLYEKNKDITVYERSV

Nuo H1, Acc.No. O67336, 336 AA, Mr: 36923 Da, 8 TMH

MEAIAYSLAFTFLKIVIVFSLALGIGAYLTWFERKLAGHIQNRLLGPTVVGKFGILQPLADALKLATKE
VIIPRGADKPVYYAAVVMALVPSILLTIIPFGPGFRVGNITYEPIIADVNIALLAFAGSLSVYGTIFS
GWASNSKYAFIGSLRKAAVVIAYEVVLGFSVLGVILLAGTLSTVGIVEAQIQKGVWFIFYQPVAFILY
LFCMLAESGRVPFDIQEAEALVTGYNVEYGGMKFGAFPLAEWYVNVIALSAIAVVLFFGGWDGPH
IFGPLSPYFWFVKTFALVFFTLWLHWTLPRFQAKDITEIAWKILLPIAILNVIITAVVYAF

Nuo H2, Acc.No. O67384, 259 AA, Mr 28785 Da, 5 TMH

MHSFWINLLFAVIKIVVILLIALGIGAFLTWVERKVAAHIQRRPGPMVVGWHGLLQPLANGLKLLTK
EDLFPRYGDKFLYHLAILALVPATLVFSVVPFGPEFEVFGYKVKPILSDVNVGLLLVFALGSMAYYA
VALAGWASNSKYPLIASMRKAGVLVSIEVVITFAVMGPIMLAGTLSTYEIVQKQIEQNLWYIWWQP
IAFVVYMFALAEMGRVPFDVQEAELVTGFTVEYGGMKFGLFPLVEWYIEVLPCLL

Nuo H3, Acc.No. O67385, 100 AA, Mr 11599 Da, 3 TMH

MVHRSLTLSAIAVVLFFGGWSPINIPVGFVDPLFFLGPLSPFVWFILKTTALFLFILWLHWTLPRYRI
DQITQNAWKIMLPLTLFNIVLTAVLAPIVWR

Nuo I1, Acc.No. O67337, 201 AA, Mr 23410 Da, 1 TMH

MGVKKLSRKDYLNILESILFIDFLKGLSVTLKNLLRRPITTEYPKEKLTPPKRFRGAHGHYVWDGTEP
DSLKAIEKFMSYEKAKSRCVACYMCQTACPMPTLFRIEAVQLPNGKKKVVRFDMNLLNCLFCGLC
VDACPVGCLTMTDIFELANYSRNEVLRMEDLEKFAIDFKQRRGNPDRIWPNDEEREKLGWKIEW
SG

Nuo I2, Acc.No. O67386, 208 AA, Mr 24572 Da, 1 TMH

MIKKVAAKPLSWLERIFFIDFIKGLRITLKNALRKTTITHYPYEKITPPKRFRGYFAHKVVDGTEPQPA
FQEWVNRYNILVEYGKSRVCLRCKRACVPVQLFEIEGKKLPNGKRVVSVFNMNMLLCTYCGFC
VDACPVDCLYQTDIHENASYTRKDAVLTLEILEIQIGRDWQRRREREPDRIWIDDEQRMKLWGENNV
KLPKPEEV

Nuo J1, Acc.No. O67338, 162 AA, Mr 17859 Da, 5 TMH

MEWLIFFILGAWLIISALGTVLAKNPIHVMLFFLSSLLAMAGLFLSLGAELLAGLQLIYAVAIVVFYV
LAITTIPWEKIKRFEGVYKTEILTASPILLVLFLVMSYMKVKGKFAEPSGVVKDNVEAVGRTLFTSYLF
PFEVASVILLVAMVGAILLARKEE

Nuo J2, Acc.No. O67387, 178 AA, Mr 19375 Da, 5 TMH

MMGRLLIFGFFSILAILSGIGITLRNPVYVVVALLSSLIAVAGIFFTAGAELVGALQLLIYAVAIAVFYI
IVISAVPWEKAKKSESHYRFEGSLSPVVLFLYIEMIVVFLGKVKASPEGKIAKFIEKFGNTEVIGAILF
SKYFLAFEVVSIVLLMGMIGAVLIGRKESQTYEDDTA

Nuo K1, Acc.No. O67339, 100 AA, Mr 10738 Da, 3 TMH

MDIIKAYIILSIALFLIGLLGVIVRKNLITVLVSTELMLNGINLALVAADKVLGRVDGQIFAFFVLTVA
AAEVAVGLGLIVAIFRLKGYEASHEISQLRD

Nuo K2, Acc.No. O67388, 102 AA, Mr 10905 Da, 3 TMH

MKTIPLEAFLTVSMILFGLGLIGIARRNLVTVLMSLELALNAVNIALVGADHYLGLAEGQIFALFIAL
AATEAAVGLGIIAIFRLKKVESTDEIRELRG

Nuo L1, Acc.No. O67340, 622 AA, Mr 68941 Da, 15 TMH

MSMMVELGVIFTPLIAFLIILLFGRKIGDLGSGIIASVGAGLTTLFSLVVALKAHSPVHVKLYDFLPIG
NYTSLGIFYFDSLSSLMALVVTFFVATLIFVYSIGYMRDEFGKWVFKFYAYLSLFLFAMLLIVLSDNL
LGIFFGWEGVGLASYLLIGYYHEQKKATKASFEAFVMNRIGDWLFIFGIYSFYLFKTLEITQIFPKVE
EVDKYALGVATMLLFGGAVGKSGQFPLHTWLPNAMAGPTPVSALLHAATMVAAGVYMMVARLYP
MFEATPQTLKLIVLIGAITMTMAALAGAVHNDIKKIIAFSTMSQLGYMFVALGVGDKGGAMFHLTT
HAFFKALLFLAAGAVITAFHHHLYDIFKMGGLKKYMPVTYVAFMIGALSLAGVFPFSGFWSKDRIV
ASMYEWSGVGLVGLTIVAFITAYYAFREGFLVFHGRERWREIYDKDVHEVEGVMTPMGLLGFLT
VLTGLFGLWLEHWYVGLIGGEEKGIHLSVALVSLGVAIAGIWLWPVYVKKVIDYNKAYESLKFIH
TTFKEQFFTEKLYHNVVAGGYLTYSRSLYSTVERLFDIGIVNATYPIVELLGSVLKFFQNGRLSWYV
MGLATGLTHVLILFAITIRGGL

Nuo L2, Acc.No. O67027, 787 AA, Mr 88988 Da, 20 TMH

MQYMIILPILLQLVSAFLVYRLENRVLGARLSTSFTLTNFLISLILLTGSFGHFSLSFGVLELFPDRGL
LLSTYILLVSSVIHKYAENYMRDEPGYRRFYALLDLMTATLILLVVAGNLLLLFFAWHLVGVLLFLL
LNHNYREEKAVRFANLSFITQRLADVPLLIAIVLLYLEFRTL SIPELEKAVLSFEGYSFTLWVVP LLVV
MSAMIKSAQVPFHLWLVSMEGPTPVSALMHAGIVNAGAF LVNR TAFLF THENPGLYL AFFVGS LT
AILGSALMLIQNDVKKSLGYSTVGQMGYVMMEFGIGAFALAVYHMMAHGIFKATFLYSGNVIHS
ARKDPNIPEDEVYKVVTRGIKFEKNVPWLLYALLSILVPLLVLVLIHLIVEEHFLEYETQLIIFFFAWA
TGAQAVISTFRTEREKPLLSALIAILSLLIFLLGYVVMGHTLSKFLYPNQEIIRIYESSFANTVVLIAEM
ILIGLILAGWVFIYYANKEKFLTFNTFVYTHLSRELYFTDLYEFIKEFLKVS DVLK KESVFAGISLFA
LFLALELSTADFVK TLLGLFIPLPSVYLILKLKGNPYTYSVLLIGSLLGVVFFGEISLSPLVPLITF
AFFSLRSLSSRNLSEFIPDIFGASASVLWISSKFWLGIFVAFGILILVYLGEFLRKYYGSSEFGFITGLE
KAPKFSALTFITALFLYGAPLFTFYAYYYAGIELNLYTYALFLIGWVILSTAILVSLGKFLFYREREDL
IYTDLDDR VFKPALGILVLLL VIGFFIA

Nuo L3, Acc.No. O67389, 644 AA, Mr 71948 Da, 15 TMH

MEGLFVIFTPLIAFLIILAFGRKIGDLGSGIIASVGAGLTTLFSLVVALKAHSPHVKLYDFLPIGN YTL
SLGIFYFDSLSSLMALVVTFFVATLIFVYSIGYMRDEFGKWVFKFYAYLSLFLFAMLLIVLSDNLLGIFF
GWEGVGLASYLLIGYYHEQKKATKASFEAFVMNRIGDWLFIFGIYSFYLFKTLEITQIFPKVEEVDK
YALGVATMLLFGGAVGKSGQFPLHTWLPNAMAGPTPVSALLHAATMVAAGVYMMVARLYP MFEA
TPQTLKLIVLIGAITMTMAALAGAVHNDIKKIIAFSTMSQLGYMFVALGVGDKGGAMFHLTT HAF
KALLFLAAGAVITAFHHHLYDIFKMGGLKKYMPVTYVAFMIGALSLAGVFPFSGFWSKDRIVASMY
EWSGVGLVGLTIVAFITAYYAFREGFLVFHGRERWREIYDKDVHEVEGVMTPMGLLGFLT VLTGL
FGLWLEHWYVGLIGGEEKGIHLSVALVSLGVAIAGIWLAWAVYVKEVIDYNKAYESLKFIHTTFKE
QFFTEKLYHNVIAGGYLVVSRVAYKVGDR TVIDGFINALYKYFFKFKFLWKYLDIKIIDVLIHETVL
TAFRLGRLSRRLQTGLVNHYILFLAVGLTFILGIMLYILDRL

Nuo M1, Acc.No. O67341, 491 AA, Mr 55034 Da, 14 TMH

METLLNVAIFLPLVGALLVAVIRNEIFAKVASILIGAVVALISLVLFVNFDFSKKGQFETYVPWIKTL
GIGYHVGVDGMAISLILMTSILFLAAYIWSWKIEDRPSLYFALFLALETACIGVFAALDLFLFYLFWE
GMLIPMYFIIGFWGHDRKVVYAANKFFLYTFFGSLFLLLGIA SILVYGYFETGKISFDYFFHLGLDYPL
WLELIAFLLFGIGFAVKIPMWPFHTWLPDAHVEAPTAGSVILAGVLLKMGTYGFVRFSLPFFPEASK
YYIPLIFTL SVVAVIYAAMMAIAQTHMKRLIAYSSISHMGLVTLGTFAMNSDALNGAIYLMIAHGLS
SAALFLGAGFIYDRIHSYHMDDLGGGLARYIPYFTFAFFLAVLAGIAFPGFASFVSEFLILLGIFEKFPV
WAFVAGIGMVLGAAYS LYMFRRKVMLEESIPERVEKWKKLKDLELHHAIPFALIIGMALVMGIYP
YPFVKIVEHTSKLVFGG

Nuo M2, Acc.No. O67390, 501 AA, Mr 56526 Da, 13 TMH

MEKVGFEFPIISVSLAIPAVFAVLILFFKEKFAKYIALLTGTLTFLVSLIALFKDFDARDNVIQFYEEYTI
LKELGVKLSLGMDGLSLLMYFLTTLVSLIAVIWSIGDEKIKHRLKEYYIAFLLTESFVIGVFTTFNLIV
FFVIFYELTLLPMLFVIGIWGYKLRLYSAYKFFVYIFISSLFLLLGIA SISTYHYKMNGSFTFEYLELLNL
NIPNGFEIFLFLFFIAFAVKTPIVPFHTWLPDAHGEAPTAGSVVLAAILLKMGTYALVRFNIGLFPDA
ALELSPYLVALGIYSIIMASWMTISQTNIKRFVAYSSVSHMGFVVTA AFLNMEGLRASHIEMFAHGL
TSAGLFMVAGYIYNKLHTFNFASLRGAIKFMPLFATITAATAFAAMGLPGGSSFWGKFLTILAAREY
STPLAFLVVF AAFSSAAYVLYFLKTLYLDVREESVLIHFKDVSGYPLVAFLMIVIPVLLVGVFPFIFFA
FYNEFLVHLLKYVLKLPF

Nuo N1, Acc.No. O67342, 464 AA, Mr 51286 Da, 11 TMH

MNWNAILPEAILAIGILTVFILELFLEKHYKFLSVLAFIFVVLSGYSIFFVNYPAKLFFDGFSVDALNL
IGKLFILAVTGFVLLSSYDYFSKKN SQYGELPYLYLIATLGLMVMISSDNLAIFTGLELASITMYILVG
LFRREYLSKEGAFKYL VIGTTGTSMYALGSALVYASSGSMVLSPVKEENTLFALGVILIISALALKVS
AVPFHFWTPDAYEGAPTPTTAYLSTVPKIGMYFLFVKLTMYLFSAFPDWKYVVMLLAVLSMFYGNI
VAYA QKSVKRLLAYSSIAHAGYFLTALTAVDKHLFSALLFYVFVYALATVGAF TVLAILEKKEGWT
HHFLDFKGLKEENPVLASMLALFLFALIGIPPAAVFLGKLGIFGLVK TDMFALGILFAIASLISAGYY
LKVIVYMFLYSGEVRHGGQTTVSAGEAFTVLGTAFLVIFFGFLPHVVLDFILRALS

Nuo N2, Acc.No. O67391, 488 AA, Mr 54265 Da, 12 TMH

MDLRALIGVIEIPDLKKFLPEFILLLLAFILFTLELFKGGKERRRLVLNVVSYVGYFSVLMSLLIPWMYK
GDTFYGNFTNDPLAVTVKIFAVLITLAILPFASSYFSAKKSFYGEFYIILAFTLLGVFVLASTYNLIILY
VALELVSVGFYILTALLRGSTEAKKEGAFKYLILGGLSIALASYGAAFMYIYSGSLDLREILTYQGKDI
HYLVGLGVFFLIGLAVKIGAVPFHYWVPDAYQGAPTPVTALMASVGKLAFFIPLVRVMPLVQEKFS
LVWTITVGVI AALTMLYGNLVALVQKDVKRLAYSSIAHSGYIMAGAAVAKVIGMKAVIYFLVAY
AVMSAGAFVLALMEKNPEWQNYMENFYGLRFNAPYIAFAFFVYMVALLGVPPTVGFVGKALVF
MALSFDKLWWLAFIMLSAAISTGYIIRLVVVMYMHREKEIRSAPSHLGEKFSLFALT LASVLLGV
LPSLVWFLIKQSAENLFTG

9.2 Gele mit MBA und EDA als Quervernetzer

Folgende Peptidlisten gehören zu den Kapiteln 4.2.13 und 4.2.14 des Ergebnisteils.

AA – Proteinabschnitt; $M+H^+$ – gemessene protonierte Peptidmasse; Mr – berechnetes Molekulargewicht; üSS – überlesene Schnittstellen; Mod. – Modifikationen

Tab. 9.1 Peptidliste ADH

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA/EDA	85-92	836,4493	835,444	-2	0	IGDYAGIK	
	304-311	968,4816	967,4763	-2	0	EALDFFAR	
	31-39	1013,5995	1012,5917	1	0	ANELLINVK	
	9-18	1136,5748	1135,5662	1	0	GVIFYESHGK	
	288-299	1251,6676	1250,6619	-1	0	SISIVGSYVGNR	
	213-224	1312,6823	1311,6711	3	0	SIGGEVFIDFTK	
	277-287	1355,6123	1354,601	3	0	CCSDVFNQVVK	
	320-332	1447,8066	1446,797	2	0	VVGLSTLPEIYEK	
	213-226	1569,8192	1568,8086	2	1	SIGGEVFIDFTKEK	
	198-212	1618,844	1617,8362	0	1	VLGIDGGEGKEELFR	
	320-335	1851,975	1850,9699	-1	1	VVGLSTLPEIYEKMEK	Ox (M)
	61-81	2019,0751	2018,0619	3	0	LPLVGGHEGAGVVVGMGENVK	
	61-81	2035,0732	2034,0568	4	0	LPLVGGHEGAGVVVGMGENVK	Ox (M)
	235-258	2312,1533	2311,1404	2	0	ATDGGAGHVINVSVEAAIEASTR	
	213-234	2365,3108	2364,2941	4	2	SIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLK	
	165-192	2716,4368	2715,3802	18	0	SANLMAGHWVAISGAAGGLGSLAVQYAK	Ox (M)
inkl. Tryptophan-Oxidationen							
	165-192	2748,3298	2747,3701	-17	0	SANLMAGHWVAISGAAGGLGSLAVQYAK	2 Ox (W) Ox (M)
MBA	85-92	968,4826	967,4763	-1	0	EALDFFAR	
	304-311	1136,5768	1135,5662	3	0	GVIFYESHGK	
	288-299	1251,6687	1250,6619	0	0	SISIVGSYVGNR	
	213-224	1312,684	1311,6711	4	0	SIGGEVFIDFTK	
	300-311	1386,7394	1385,7337	-1	0	ANGTTVLVGMMPAGAK	
	320-332	1447,8116	1446,797	5	0	VVGLSTLPEIYEK	
	213-226	1569,8113	1568,8086	-3	1	SIGGEVFIDFTKEK	
	198-212	1618,844	1617,8362	0	1	VLGIDGGEGKEELFR	
	316-332	2019,0491	2018,0619	-10	0	LPLVGGHEGAGVVVGMGENVK	
	235-258	2312,1484	2311,1404	0	0	ATDGGAGHVINVSVEAAIEASTR	
	213-234	2365,2976	2364,2941	-2	2	SIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLK	

Tab. 9.2 Peptidliste Amylase

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA/EDA	166-177	794,3726	794,3711	2	0	AWTDFR	
	274-280	872,4515	872,4505	1	0	DWVQAVR	
	338-346	958,5458	958,5448	1	0	LLDGTVVSR	
	166-175	1251,6144	1251,6149	0	1	AWTDFRFPGR	
	453-467	1342,7115	1342,7092	2	0	SGLAALITDGPGGSK	
	155-165	1367,6243	1367,6205	3	0	NQETSEEQIK	
	110-122	1411,7061	1411,7055	0	0	SELQDAIGSLHSR	
	338-350	1449,7974	1449,794	2	1	LLDGTVSRHPEK	
	123-135	1483,7828	1483,7783	3	0	NVQVYGDVVLNHHK	
	475-487	1495,6713	1495,6692	1	0	NAGETWYDITGNR	
	453-468	1498,8105	1498,8103	0	1	SGLAALITDGPGGSKR	
	269-280	1522,8035	1522,8045	-1	1	FSFLRDWVQAVR	
	407-420	1607,9175	1607,9134	3	1	EIPSLKDNIEPILK	
	286-300	1786,8035	1786,7984	3	0	EMFTVAEYWQNNAGK	
	286-300	1802,804	1802,7934	6	0	EMFTVAEYWQNNAGK	Ox (M)
	246-260	1825,8654	1825,8788	-7	0	WGIWYANESLDGFR	
	386-401	1840,8115	1840,7978	7	0	ESGYPQVFYGDYMGTK	
	386-401	1856,8024	1856,7927	5	0	ESGYPQVFYGDYMGTK	Ox (M)
	106-122	1860,9271	1860,933	-3	1	YGTKSELQDAIGSLHSR	
	136-154	1898,8984	1898,897	1	0	AGADATEDVTAVEVNPANR	
	245-260	1953,9388	1953,9737	-18	1	KWGIWYANESLDGFR	
	475-492	2025,9413	2025,9392	1	1	NAGETWYDITGNRSDTVK	
	493-514	2393,137	2393,1288	3	0	IGSDGWGEFHVNDGVSIVVQK	Ox (M)
	424-444	2531,1509	2531,1506	0	0	EYAYGPQHDIYDHPDVIGWTR	
	54-76	2550,325	2550,3118	5	0	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	
	423-444	2659,2481	2659,2455	1	1	KEYAYGPQHDIYDHPDVIGWTR	
	469-492	2705,2486	2705,2755	-10	2	MYAGLKNAGETWYDITGNRSDTVK	Ox (M)
	53-76	2706,3492	2706,4129	-24	1	RLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	
	308-336	3188,5035	3188,4622	13	0	TSFNQSVFDVPLHFNLAASSQGGGYDMR	Ox (M)
inkl. Tryptophan-Oxidationen							
	166-171	810,3729	810,3661	8	0	AWTDFR	Ox (W)
	274-280	888,4509	888,4454	6	0	DWVQAVR	Ox (W)
	166-175	1267,6142	1267,6098	3	1	AWTDFRFPGR	Ox (W)
	475-487	1511,67	1511,6641	4	0	NAGETWYDITGNR	Ox (W)
	493-514	2425,1434	2425,1187	10	0	IGSDGWGEFHVNDGVSIVVQK	2 Ox (W)
	424-444	2563,2164	2563,1404	30	0	EYAYGPQHDIYDHPDVIGWTR	2 Ox (W)
	423-444	2675,2413	2675,2405	0	1	KEYAYGPQHDIYDHPDVIGWTR	Ox (W)
MBA	166-171	794,3746	794,3711	4	0	AWTDFR	
	166-175	1251,6141	1251,6149	-1	1	AWTDFRFPGR	
	155-165	1367,6261	1367,6205	4	0	NQETSEEQIK	
	110-122	1411,7061	1411,7055	0	0	SELQDAIGSLHSR	
	338-350	1449,7934	1449,794	0	1	LLDGTVSRHPEK	
	123-135	1483,7797	1483,7783	1	0	NVQVYGDVVLNHHK	
	475-487	1495,6816	1495,6692	8	0	NAGETWYDITGNR	
	453-468	1498,8078	1498,8103	-2	1	SGLAALITDGPGGSKR	

9. Anhang

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
	269-280	1522,7973	1522,8045	-5	1	FSFLRDWVQAVR	
	407-420	1607,915	1607,9134	1	1	EIPSLKDNIEPILK	
	386-401	1840,818	1840,7978	11	0	ESGYPQVFYGDYMYGTK	
	386-401	1856,8118	1856,7927	10	0	ESGYPQVFYGDYMYGTK	Ox (M)
	106-122	1860,9338	1860,933	0	1	YGTKSELQDAIGSLHSR	
	136-154	1898,8931	1898,897	-2	0	AGADATEDVTAVEVNPANR	
	475-492	2025,941	2025,9392	1	1	NAGETWYDITGNRSDTVK	
	104-122	2090,0809	2090,0756	3	2	TKYGTKSELQDAIGSLHSR	
	493-514	2393,1324	2393,1288	1	0	IGSDGWGEFHVNDGVSIVVQK	
	424-444	2531,1336	2531,1506	-7	0	EYAYGPQHDIYDHPDVIGWTR	
	54-76	2550,3338	2550,3118	9	0	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	
	77-99	2593,1829	2593,1609	8	0	GLSQSDNGYGPYDLYDLGEFQQK	
	423-444	2659,2364	2659,2455	-3	1	KEYAYGPQHDIYDHPDVIGWTR	
	53-76	2706,3511	2706,4129	-23	1	RLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	
	308-336	3172,4329	3172,4673	-11	0	TSFNQSVFDVPLHFNLQAASSQGGGYDMR	
	308-336	3188,4698	3188,4622	2	0	TSFNQSVFDVPLHFNLQAASSQGGGYDMR	Ox (M)
	136-165	3248,4932	3248,5069	-4	1	AGADATEDVTAVEVNPANRNQETSEEYQIK	

Tab. 9.3 Peptidliste BSA

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA/EDA	223-228	706,353	705,3479	-3	0	CASIQK	
	29-34	712,3601	711,3664	-19	0	SEIAHR	
	341-346	752,3722	751,35	20	0	NYQEAK	
	198-204	758,4029	757,4156	-26	0	GACLLPK	
	562-568	818,4153	817,4181	-12	0	ATEEQLK	
	242-248	847,4977	846,4963	-7	1	LSQKFPK	
	483-489	898,4831	897,4742	2	0	LCVLHEK	
	249-256	922,4844	921,4807	-4	0	AEFVEVTK	
	161-167	927,4951	926,4861	2	0	YLIEIAR	
	413-420	1068,4474	1067,4342	6	0	QNCDQFEK	
	588-597	1107,5331	1106,5066	17	0	EACFAVEGPK	
	499-507	1138,5016	1137,4907	3	0	CCTESLVNR	
	548-557	1142,7142	1141,707	0	1	KQTALVELLK	
	66-75	1163,6339	1162,6234	3	0	LVNELTEFAK	
	25-34	1193,6085	1192,5949	5	1	DTHKSEIAHR	
	35-44	1249,6239	1248,6139	2	1	FKDLGEEHFK	
	361-371	1283,7131	1282,7034	2	0	HPEYAVSVLLR	
	402-412	1305,7186	1304,7088	2	0	HLVDEPQNLIK	
	569-580	1399,7007	1398,6853	6	0	TVMENFVAFVDK	
	569-580	1415,6964	1414,6803	6	0	TVMENFVAFVDK	Ox (M)
	89-100	1419,7003	1418,6864	5	0	SLHTLFGDELCK	
	360-371	1439,8132	1438,8045	1	1	RHPEYAVSVLLR	
	286-297	1443,6526	1442,6347	7	0	YICDNQDTISSK	
	421-433	1479,7952	1478,7881	0	0	LGEYGFQNALIVR	
	438-451	1511,845	1510,8355	1	0	VPQVSTPTLVEVSR	
	298-309	1532,7837	1531,7738	2	1	LKECCDKPLLEK	
	347-359	1567,7423	1566,7354	0	0	DAFLGSFLYEYSR	
	139-151	1576,7727	1575,7603	3	0	LKPDPTLTCDEFK	
	437-451	1639,9382	1638,9305	0	1	KVPQVSTPTLVEVSR	
	347-360	1723,8545	1722,8365	6	1	DAFLGSFLYEYSRR	
	469-482	1724,8385	1723,8273	2	0	MPCTEDYLSLILNR	
	469-482	1740,8359	1739,8222	4	0	MPCTEDYLSLILNR	Ox (M)
	508-523	1880,9227	1879,9138	1	0	RPCFSALTPDETYVPK	
	169-183	1888,9357	1887,9195	5	0	HPYFYAPELLYYANK	
	123-138	1901,8834	1900,8625	7	1	NECFLSHKDDSPDLPK	
	529-544	1907,9288	1906,9135	4	0	LFTFHADICTLPDTEK	
	581-597	1927,8245	1926,791	14	1	CCAADDKEACFAVEGPK	
	139-155	2019,9838	2018,9619	7	1	LKPDPTLTCDEFKADEK	
	168-183	2045,0273	2044,0206	0	1	RHPYFYAPELLYYANK	
	139-156	2148,0737	2147,0568	4	2	LKPDPTLTCDEFKADEKK	
	267-285	2247,9536	2246,9354	5	1	ECCHGDLLCADRADLAK	
	341-359	2301,082	2300,0749	0	1	NYQEAKDAFLGSFLYEYSR	
	524-544	2498,1914	2497,1835	0	1	AFDEKLFTFHADICTLPDTEK	
	118-138	2541,1804	2540,1601	5	2	QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	
	264-285	2612,1626	2611,1577	-1	2	VHKECCHGDLLCADRADLAK	

9. Anhang

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA	161-167	927,4913	926,4861	-2	0	YLYEIAR	
	588-597	1107,533	1106,5066	17	0	EACFAVEGPK	
	66-75	1163,636	1162,6234	5	0	LVNELTEFAK	
	25-34	1193,6079	1192,5949	5	1	DTHKSEIAHR	
	35-44	1249,6251	1248,6139	3	1	FKDLGEEHFK	
	361-371	1283,7103	1282,7034	0	0	HPEYAVSVLLR	
	402-412	1305,7213	1304,7088	4	0	HLVDEPQNLIK	
	569-580	1399,7009	1398,6853	6	0	TVMENFVAFVDK	
	569-580	1415,7028	1414,6803	11	0	TVMENFVAFVDK	Ox (M)
	89-100	1419,7041	1418,6864	7	0	SLHTLFGDELCK	
	360-371	1439,8153	1438,8045	2	1	RHPEYAVSVLLR	
	421-433	1479,7976	1478,7881	1	0	LGEYGFQNALIVR	
	438-451	1511,8271	1510,8355	-10	0	VPQVSTPTLVEVSR	
	347-359	1567,7487	1566,7354	4	0	DAFLGSFLYEYSR	
	437-451	1639,9382	1638,9305	0	1	KVPQVSTPTLVEVSR	
	469-482	1724,8472	1723,8273	7	0	MPCTEDYLSLILNR	
	469-482	1740,8557	1739,8222	15	0	MPCTEDYLSLILNR.	Ox (M)
	184-197	1747,7411	1746,6978	21	0	YNGVFQECCQAEDK	
	508-523	1880,9326	1879,9138	6	0	RPCFSALTPDETYVPK	
	169-183	1888,9419	1887,9195	8	0	HPYFYAPELLYYANK	
	529-544	1907,9409	1906,9135	11	0	LFTFHADICTLPDTEK	
	168-183	2045,0376	2044,0206	5	1	RHPYFYAPELLYYANK	
	45-65	2492,2703	2491,257	2	0	GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	

Tab. 9.4 Peptidliste CAH

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA/EDA	159-167	973,5532	972,5491	-3	0	VLDALDSIK	
	81-89	979,4838	978,4771	-1	0	DGPLTGTYR	
	28-36	1002,515	1001,5029	5	0	QSPVDIDTK	
	149-158	1012,5451	1011,5349	3	0	VGDANPALQK	
	10-18	1141,5316	1140,5213	3	0	HNGPEHWHK	
	213224	1346,6643	1345,6911	-25	0	EPISVSSQQMLK	
	77-89	1390,766	1389,7616	-2	1	AVLKDGPLTGTYR	
	114-126	1581,8179	1580,8099	0	0	YAAELHLVHWNTK	
	113-126	1709,9073	1708,9049	-3	1	KYAAELHLVHWNTK	
	112-126	1837,9775	1836,9998	-16	2	KKYAAELHLVHWNTK	
	10-27	2140,9666	2139,9987	-18	1	HNGPEHWHKDFPIANGER	
	37-57	2198,2214	2197,2106	2	0	AVVQDPALKPLALVYGEATSR	
	127-148	2253,1694	2252,1478	6	0	YGDFGTAAQQPDGLAVGVFLK	
	37-58	2354,3284	2353,3118	4	1	AVVQDPALKPLALVYGEATSR	
	90-111	2584,1724	2583,1528	5	0	LVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDR	
	90-112	2712,2705	2711,2477	6	1	LVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDRK	
	227-251	2852,4666	2851,469	-3	0	TLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLK	
	227-251	2868,4954	2867,4639	8	0	TLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLK	Ox (M)
inkl. Tryptophan-Oxidationen							
	114-126	1597,8118	1596,8049	0	0	YAAELHLVHWNTK	Ox (W)
	114-126	1613,8115	1612,7998	3	0	YAAELHLVHWNTK	2 Ox (W)
	2-18	2141,9827	2140,9365	18	1	SHHWGYGKHNGPEHWHK	3 Ox (W)
	2-18	2157,9829	2156,9314	21	1	SHHWGYGKHNGPEHWHK	4 Ox (W)
	90-111	2600,1699	2599,1477	6	0	LVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDR	Ox (W)
	90-111	2616,176	2615,1426	10	0	LVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDR	2 Ox (W)
	227-251	2884,4863	2883,4589	7	0	TLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLK	Ox (M); Ox (W)
MBA	159-167	973,5298	972,5491	-27	0	VLDALDSIK	
	81-89	979,4747	978,4771	-10	0	DGPLTGTYR	
	149-158	1012,5327	1011,5349	-9	0	VGDANPALQK	
	19-27	1018,485	1017,4879	-10	0	DFPIANGER	
	77-89	1390,7506	1389,7616	-13	1	AVLKDGPLTGTYR	
	114-126	1581,8177	1580,8099	0	0	YAAELHLVHWNTK	
	10-27	2140,9998	2139,9987	-3	1	HNGPEHWHKDFPIANGER	
	37-57	2198,2131	2197,2106	-2	0	AVVQDPALKPLALVYGEATSR	
	127-148	2253,1638	2252,1478	4	0	YGDFGTAAQQPDGLAVGVFLK	
	37-58	2354,3145	2353,3118	-2	1	AVVQDPALKPLALVYGEATSR	
	90-111	2584,1536	2583,1528	-3	0	LVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDR	
	227-251	2852,4299	2851,469	-16	0	TLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLK	
	227-251	2868,4814	2867,4639	4	0	TLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLK	

Tab. 9.5 Peptidliste Serotransferrin

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA/EDA	547-553	735,3888	734,3963	-20	0	GDVAFVK	
	565-571	827,4019	826,3973	-3	0	NPDPWAK	
	316-323	874,4431	873,4345	2	0	DSAHGFLK	
	468-475	887,4142	886,4079	-1	0	SCHTAVGR	
	601-609	964,5303	963,525	-2	0	APNHAVVTR	
	62-69	997,4774	996,4698	0	0	ASYLDCIR	
	669-676	1000,4966	999,4913	-2	0	YLGEYVK	
	601-610	1092,6222	1091,62	-5	1	APNHAVVTRK	
	61-69	1125,5714	1124,5648	-1	1	KASYLDCIR	
	554-564	1166,5911	1165,584	0	0	HQTVPQNTGGK	
	660-668	1175,5773	1174,5731	-3	1	LHDRNTYEK	
	123-132	1195,553	1194,5452	0	0	DSGFQMNQLR	
	123-132	1211,5487	1210,5401	1	0	DSGFQMNQLR	Ox (M)
	38-46	1224,5333	1223,5176	7	1	CQSFRDHMK	Ox (M)
	454-464	1249,6071	1248,5986	1	0	SASDLTWDNLK	
	226-236	1273,6549	1272,6462	1	0	HSTIFENLANK	
	300-310	1276,6348	1275,6248	2	0	EFQLFSSPHGK	
	531-541	1283,5696	1282,5618	0	0	EGYYGYTGAFR	
	122-132	1323,6643	1322,6401	13	1	KDSGFQMNQLR	
	122-132	1339,6442	1338,635	1	1	KDSGFQMNQLR	Ox (M)
	542-553	1364,7147	1363,717	-7	1	CLVEKGDVAFVK	
	453-464	1377,6993	1376,6936	-1	1	KSASDLTWDNLK	
	332-343	1478,7358	1477,7275	1	0	MYLGYEYVTAIR	
	311-323	1490,8032	1489,7929	2	1	DLLFKDSAHGFLK	
	298-310	1491,7721	1490,7518	9	1	SKEFQLFSSPHGK	
	332-343	1494,7373	1493,7224	5	0	MYLGYEYVTAIR	Ox (M)
	372-384	1521,7465	1520,7293	6	1	LKCDEWSVNSVGK	
	684-696	1531,6941	1530,6807	4	0	CSTSSLLEACTFR	
	647-659	1565,8013	1564,7919	1	1	DLLFRDDTVCLAK	
	495-508	1577,7025	1576,6504	28	0	FDEFFSEGCAPGSK	
	588-600	1586,7782	1585,7671	2	0	KPVEEYANCHLAR	
	476-489	1593,8173	1592,8021	5	0	TAGWNIPMGLLYNK	Ox (M)
	226-239	1615,8098	1614,8114	-5	1	HSTIFENLANKADR	
	108-121	1629,8275	1628,8086	7	0	EDPQTFYYAVAVK	
	683-696	1659,7965	1658,7756	8	1	KCSTSSLLEACTFR	
	516-530	1706,79	1705,7586	14	0	LCMGSGNLCEPNNK	
	237-251	1881,89	1880,8687	7	1	ADRDQYELLCLDNTR	
	572-587	1952,9489	1951,9309	5	1	NLNEKDYELLCLDGTR	
	554-571	1974,9889	1973,9708	5	1	HQTVPQNTGGKNPDPWAK	
	643-659	2011,0278	2010,0092	6	2	SETKDLLFRDDTVCLAK	
	144-162	2171,1018	2170,0881	3	0	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	
	252-273	2549,3079	2548,2856	6	1	KPVDEYKDCHLAQVPSHTTVAR	
	547-571	2691,3044	2690,3565	-22	2	GDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAK	
	300-323	2748,3425	2747,4071	-26	2	EFQLFSSPHGKDLLFKDSAHGFLK	

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
inkl. Tryptophan-Oxidationen							
	454-464	1265,5731	1264,5935	-22	0	SASDLTWDNLK	Ox (W)
	144-162	2187,1089	2186,083	9	0	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	Ox (W)
MBA	510-515	709,3263	708,3112	11	0	DSSLCK	
	613-618	743,354	742,3432	5	0	EACVHK	
	468-475	887,4117	886,4079	-4	0	SCHTAVGR	
	62-69	997,4764	996,4698	-1	0	ASYLDCIR	
	669-676	1000,5005	999,4913	2	0	YLGEYVK	
	61-69	1125,5725	1124,5648	0	1	KASYLDCIR	
	123-132	1195,5559	1194,5452	3	0	DSGFQMNQLR	
	123-132	1211,5468	1210,5401	0	0	DSGFQMNQLR	Ox (M)
	454-464	1249,6052	1248,5986	-1	0	SASDLTWDNLK	
	531-541	1283,5696	1282,5618	0	0	EGYYGYTGAFR	
	316-327	1323,6924	1322,7095	-18	1	DSAHGFLKVPPR	
	122-132	1339,6411	1338,635	-1	1	KDSGFQMNQLR	Ox (M)
	332-343	1478,7356	1477,7275	1	0	MYLGYEYVTAIR	
	311-323	1490,801	1489,7929	1	1	DLLFKDSAHGFLK	
	298-310	1491,7723	1490,7518	9	1	SKEQLFSSPHGK	
	332-343	1494,7344	1493,7224	3	0	MYLGYEYVTAIR	Ox (M)
	684-696	1531,7086	1530,6807	14	0	CSTSSLLEACTFR	
	647-659	1565,8024	1564,7919	2	1	DLLFRDDTVCLAK	
	588-600	1586,781	1585,7671	4	0	KPVEEYANCHLAR	
	476-489	1593,8068	1592,8021	-2	0	TAGWNIPMGLLYNK	Ox (M)
	300-315	1892,9774	1891,9832	-7	1	EFQLFSSPHGKDLLFK	
	311-323	1940,0702	1939,068	-3	2	DLLFKDSAHGFLKVPPR	
	572-587	1952,9413	1951,9309	2	1	NLNEKDYELLCLDGTR	
	643-659	2011,0226	2010,0092	3	2	SETKDLLFRDDTVCLAK	
	660-676	2157,0527	2156,0538	-4	2	LHDRNTYEKYLGEYVK	
	144-162	2171,094	2170,0881	-1	0	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	
	434-453	2200,0798	2199,0154	26	1	SDNCEDTPEAGYFAVAVVKK	
	490-508	2258,0125	2256,9681	16	1	INHCRFDEFFSEGCAPGSK	
	252-273	2549,2651	2548,2856	-11	1	KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR	

Tab. 9.6 Peptidliste BR

	AA	M+H ⁺	Mr	ppm	üSS	Sequenz	Mod.
MBA/EDA	161-168	918,435	917,428	1	2	ESMRPEVA	
	194-203	982,556	981,55	0	3	EGAGIVPLNI	
	6-14	1127,599	1126,593	-7	2	GRPEWIWLA	
	5-13	1157,61	1156,603	-10	2	TGRPEWIWL	
	68-78	1188,571	1187,565	-8	0	MVPPFGGEQNPI	
	5-14	1228,647	1227,64	-2	3	TGRPEWIWLA	
	56-66	1260,636	1259,63	4	4	MYLSMLGYGL	
	170-180	1275,778	1274,771	-7	6	TFKVLNRNVTVV	
	204-214	1282,66	1281,653	-7	6	ETLLFMVLDVS	Ox (M)
	35-46	1355,684	1354,677	-6	4	SDPDAKKFYAIT	
	169-180	1362,81	1361,803	-1	7	STFKVLNRNVTVV	
	227-239	1373,669	1372,663	-1	3	RAIFGEAEAPEPS	
	82-92	1382,71	1381,703	-2	3	RYADWLFTTPL	
	5-17	1499,8	1498,794	7	5	TGRPEWIWLALGT	
	102-117	1528,785	1527,778	-1	8	DADQGTILALVGADGI	
	225-239	1616,802	1615,796	2	4	RSRAIFGEAEAPEPS	
	1-14	1651,859	1650,852	2	5	QAQITGRPEWIWLA	Pyro-Glu (N-term)
	63-78	1695,804	1694,798	8	2	GYGLTMVPPFGGEQNPI	Ox (M)
	218-233	1719,99	1718,983	5	7	GFGILLRSRAIFGEA	
	29-44	1728,862	1727,856	3	4	VKGMGVSDPDAKKFYA	Ox (M)
	30-45	1742,878	1741,871	-2	4	KGMGVSDPDAKKFYAI	Ox (M)
	227-244	1744,813	1743,807	10	5	RAIFGEAEAPEPSAGDGA	
	46-61	1803,927	1802,92	-2	9	TTLVPAIAFTMYLSML	2 Ox (M)
	223-239	1842,971	1841,964	5	6	LLRSRAIFGEAEAPEPS	
	225-244	1987,947	1986,94	-1	6	RSRAIFGEAEAPEPSAGDGA	
	218-239	2330,25	2329,243	0	8	GFGILLRSRAIFGEAEAPEPS	
MBA	161-168	918,435	917,428	1	2	ESMRPEVA	
	161-168	934,43	933,423	-9	2	ESMRPEVA	Ox (M)
	194-203	982,556	981,55	1	3	EGAGIVPLNI	
	144-151	985,542	984,536	7	4	AMLYILYV	
	Mai 14	1228,647	1227,64	-3	3	TGRPEWIWLA	
	169-180	1362,81	1361,803	-1	7	STFKVLNRNVTVV	
	227-239	1373,669	1372,663	-2	3	RAIFGEAEAPEPS	
	82-92	1382,71	1381,703	-2	3	RYADWLFTTPL	
	26-39	1498,724	1497,718	1	4	YFLVKGMGVSDPDA	
	225-239	1616,802	1615,796	2	4	RSRAIFGEAEAPEPS	
	1-14	1651,859	1650,852	0	5	QAQITGRPEWIWLA	Pyro-Glu (N-term)
	218-233	1719,99	1718,983	5	7	GFGILLRSRAIFGEA	
	29-44	1728,862	1727,856	9	4	VKGMGVSDPDAKKFYA	Ox (M)
	30-45	1742,878	1741,871	-3	4	KGMGVSDPDAKKFYAI	Ox (M)
	218-239	2330,25	2329,243	0	8	GFGILLRSRAIFGEAEAPEPS	
	161-181	2391,306	2390,299	2	11	ESMRPEVASTFKVLNRNVTVVL	Ox (M)

9.3 2D-Experimente

Folgende Peptidliste gehört zu Kapitel 4.2.18 des Ergebnisteils.

Tab. 9.7 MS/MS-Daten der 2D-Gele über den pH-Bereich 4-7 im Vergleich

Acc. No. – Nummer des Datenbankeintrags, *Mr* – molare Masse des Peptids, *GRAVY* – Maß der Hydrophobizität; *pI* – isoelektrischer Punkt, *Avg. Ion Score* – Mittelwert des durch die Datenbanksuche erhaltenen *Mascot-Scores* für das fragmentierte Peptide ($p < 0,05$, Schwellenwert: 17); *SD* – Standardabweichung; *Max. Ion Score* – höchster Wert des durch die Datenbanksuche erhaltenen *Mascot-Scores* für das fragmentierte Peptid ($n=4-6$)

Spot	Acc. No.	Mr	Peptidsequenz	GRAVY	pI	MBA		ad MBA/EDA 0,5			
						Avg. Ion Score	SD	Max. Ion Score	Avg. Ion Score	SD	Max. Ion Score
2	Cg0587	2033,95	HTPFFDNYRPQFYFR	-1,2	9,58	23,9	11	41,5	28,7	5,5	33,7
3,4,3 1	Cg1791	991,55	GKLDGYALR	-0,51	9,52	51,4	11,2	64,9	51,2	8,1	66,1
3,4,3 1	Cg1791	1160,62	IAVYAERDPK	-0,6	6,86	33,3	5,2	41,9	34	3,4	38,9
3,4,3 1	Cg1791	1662,88	VPVITGSATDLTFNTK	0,3	6,66	79,6	7,9	92,3	88,7	10,6	102
3,4,3 1	Cg1791	1979,94	LGQEVEYDDDSITVGGKR	-0,93	3,84	109,2	11,7	124,6	114,5	12,3	132,7
3,4,3 1	Cg1791	2188	VVSWYDNEWGYTCQLLR	-0,37	4,08	112,1	12,6	129,4	103,2	9,1	111,5
3,4,3 1	Cg1791	2818,36	NLDWAAHNVDIVSTGFFT DANAAK	0,03	3,96	83,7	13	102,4	79,9	12,2	96,9
3,4,3 1	Cg1791	3990,9	EAAVGEFGETLAYSEEPVST DIVHDSHGSIFDAGLTK	-0,06	3,88	66,2	14,6	86	65,6	30,4	117,9
5,6	Cg3237	1384,67	AREEGTNPQIR	-1,91	4,44	47,2	11,4	63,3	42	4,1	46,5
5,6	Cg3237	1633,76	AVWNVFNWDDAAAR	-0,14	3,88	90,9	9,3	103,6	97,1	27,5	135,1
5,6	Cg3237	1864,94	HHATYVAGANAALALEK	-0,03	6,02	92,4	12,3	111,4	101,7	24,5	135,4
5,6	Cg3237	1940,96	NLAFNLGGHTNHSVFWK	-0,28	9,74	66,1	6,2	73,6	65,5	10,7	75
5,6	Cg3237	3002,44	FQDHFNSAALQLQSGWAVL GYDHISGR	-0,14	6,02	89,1	10,8	101,9	107,1	54	154,2
5,6	Cg3237	3482,67	AVYELPELDYAYDALEPHIAA EIMELHHSK	-0,22	4,26	26,5	3,1	28,6	22,3	9,7	37,1
6	Cg3375	1351,71	FILVSAPPESSR	0,66	6,98	31,9	9,7	43,3	38,8	9,3	45,5
7	Cg1111	1187,63	AAADSAGLPLFR	0,57	6,78	68,6	4,6	74,3	76,2	13,2	91,1
7	Cg1111	1460,76	IEQLLGDAVYAGR	0,17	4,08	98,6	9,1	110,4	120,9	9,2	131,3
7	Cg1111	1734,86	VQIVGDDFFVTNPER	-0,13	3,7	79,9	5,7	86,4	118,8	13,6	133
7	Cg1111	1863,9	GLSTGLGDEGGFAPSVGSTR	-0,15	4,08	105,8	9,9	117,3	159,1	24,3	195,5
7	Cg1111	2133,02	VNQIGTLTETFDVDMHR	-0,14	4,3	42,7	7,3	55,4	67,7	30,7	108
7	Cg1111	2385,09	AVENVNEIGDELAGEADD QR	-0,81	3,28	128,3	4,1	132,5	195,7	19	223
7	Cg1111	3597,71	GNPTVEAEVFLDDGSHGVAG VPSGASTGVHEAHLR	-0,26	4,42	125,2	14,1	140,8	132	19,9	156,3
8	Cg0766	972,54	ILAQFPER	-0,02	6,98	33,4	5,7	42	31,5	8,7	40,7
8	Cg0766	1344,74	ALDAFLEQVAR	0,73	4,08	68,7	4,5	77,3	76,3	8,1	87,7
8	Cg0766	1515,75	HVQQVQEENHLR	-1,64	6,02	40,3	4,4	43,9	41,2	9,4	50,2
8	Cg0766	1632,8	LSGMPAVFWLDPER	0,11	4,08	32,5	15	59,8	24,7	5,6	31,4
8	Cg0766	3011,51	YLADHDTEGLDIQLSPVEAT QLSIDR	-0,2	3,68	94,7	12,5	104,9	142,6	11	161
8	Cg0766	3087,45	ELQDQGYDIPELDPNATTDE EKDILAR	-1,21	3,48	105,3	11,6	116,3	126,3	19,8	155,1
8	Cg0766	3161,65	TDEAPLLATYSLKPVVEFAA TAGIEVETR	0,26	4	75,1	22	119	86,6	20,5	106,8
9	Cg1774	1493,73	VSVEAGIAMPWYR	0,42	6,88	20	6,7	29,7	22,5	9,1	31,3
9	Cg1774	1557,72	TWDSLTPGHPEYR	-1,45	5,22	49,4	5,5	56,4	50,2	3,9	53,2
9	Cg1774	2033,99	ISIEDNTEIAFNEDVVAR	-0,12	3,5	108,5	17,5	136,3	71,7	32	122
9	Cg1774	2341,05	GPSFSGPESISTETWSAEPY R	-0,89	3,96	94,1	8,7	108,7	79,6	21,1	96,4

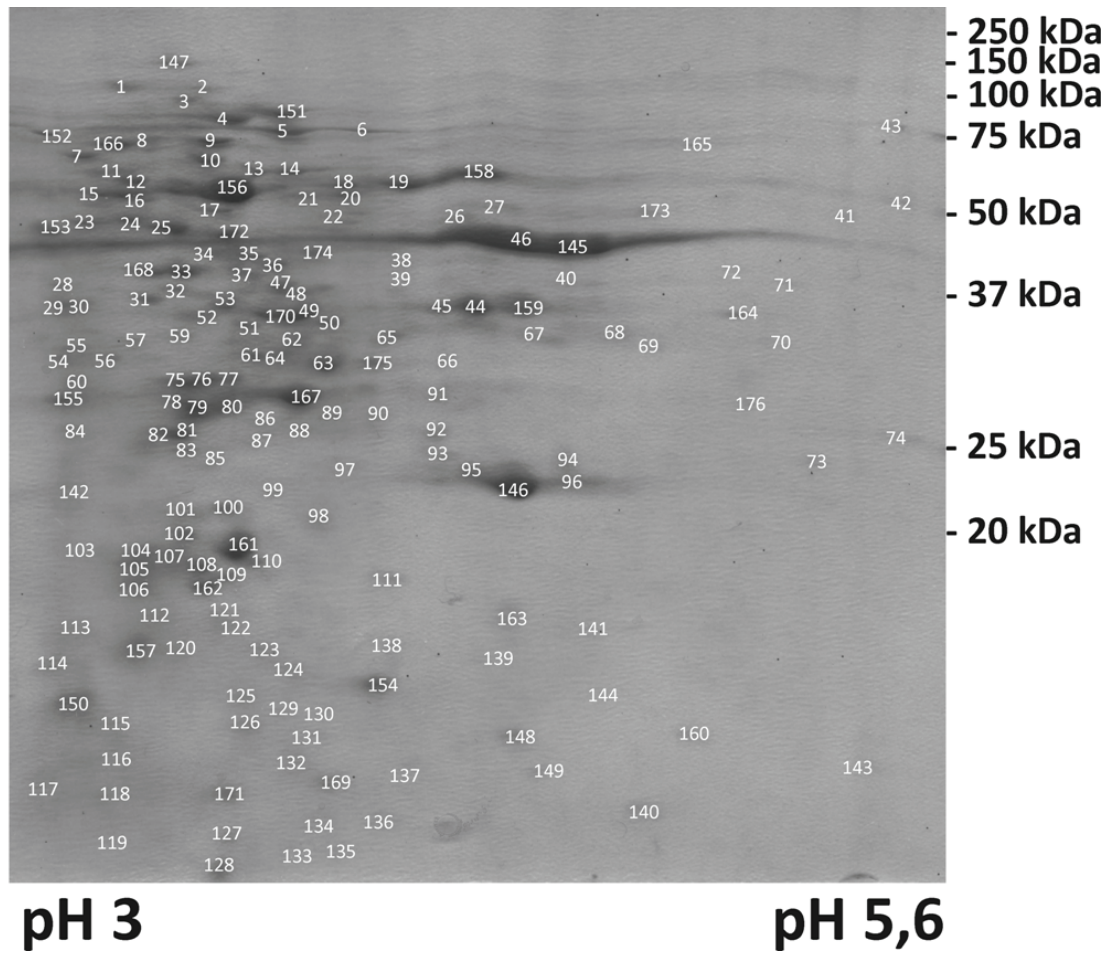
9. Anhang

Spot	Acc. No.	Mr	Peptidsequenz	GRAVY	pI	MBA		ad MBA/EDA 0,5			
						Avg. Ion Score	SD	Max. Ion Score	Avg. Ion Score	SD	Max. Ion Score
9	Cg1774	2482,18	TELGFDPEAHFAIDDEVIAHT R	-0,33	4,06	104	13,3	125,6	62,2	36,2	93
10	Cg0303	1268,58	STVEYCQLR	-0,73	6,28	45,1	9,2	53,5	43,8	10	51,7
10	Cg0303	1478,68	TIAQDYPDTNWR	-1,45	3,88	52,7	8,7	65,7	47,9	8,3	58,9
10	Cg0303	1527,79	ITVAPQWCAVDLR	0,62	6,1	69,2	7,2	79,6	56,9	5,4	63,9
10	Cg0303	1659,76	AMWDFATEYLER	-0,1	3,82	47,3	6,7	56,4	34,3	9	46,7
10	Cg0303	1783,89	LGIDVEIQEYNQHAR	-0,77	4,42	50,3	7,3	60,6	42,2	4	46,8
10	Cg0303	1953,9	YMPFEVEVEDISLPDR	-0,37	3,5	64,2	9,7	76,5	51,8	9,6	62,7
10	Cg0303	2042,96	EIEVGFPASQTDFFVR	-0,18	3,58	63,2	16,3	79,1	70,7	9,8	85,7
11	Cg2840	1807,91	IAGNFLDFLESEVAAGR	0,42	3,82	97,4	8,4	106,7	87,6	6,2	98
11	Cg2840	1936,01	KIAGNFLDFLESEVAAGR	0,18	4,44	76,5	8,4	83,3	67,2	6,9	79,1
11	Cg2840	2128,18	ESIILRPQQISNHPEVIR	-0,47	7,86	57,8	9,9	71,6	52,9	6,4	59,1
11	Cg2840	2385,17	TYIEFDTDKVVAVVETNTAD R	-0,28	3,84	119,5	7,5	133,4	110,7	4,3	115
12	Cg3068	1606,92	LRPEVLLEGQQVAR	-0,24	7,12	51,8	4,1	55,6	49,1	5	55,6
12	Cg3068	1662,79	PIATPEVYNEMLDR	-0,54	3,82	39,9	5,3	48,7	36,5	4,4	40,5
12	Cg3068	2029,08	EVLDEYVRPLAISQER	-0,24	4,16	44,3	4,7	50	46,1	6,8	53,3
12	Cg3068	2147,15	YLLAATFGNVHGVYKPGNVK	0,13	9,68	67,5	14,8	82,4	60,6	9,9	74,3
12	Cg3068	2278,09	LGLADDALPFDVFHGGSGSE K	0,08	3,96	45,3	10,2	63	37,3	6,4	45,2
12	Cg3068	2644,27	GFAEESDGHQFSTGGAEFGS GLAVK	0,21	3,68	92,1	11,3	102,1	82,8	11,4	95,4
13	Cg2833	1640,89	IQGIGANFIPEVLDR	0,35	4,08	62,4	8,6	75,3	60,6	5,7	67,5
13	Cg2833	1768,98	IQGIGANFIPEVLDRK	0,08	6,92	58,3	9,3	72	50,6	7,7	58,7
13	Cg2613	2132,02	VTDLDVHDHWYVEEFIPR	-0,35	3,84	72,6	7,1	81,3	64,4	4,2	71,9
13	Cg2613	2487,34	VLVVGNPANTNALIASAAP DVPASR	0,6	6,78	138,2	11,3	156	138,1	12,6	159,6
13	Cg2613	2646,34	NITITADANEAFDGANAFLV GAKPR	0,08	4,3	109,8	3,2	115,4	121,1	4	125,6
14	Cg1789	1430,78	VDVAVTVPFTDIR	0,88	3,88	59,6	4,9	66,5	74,2	22,4	107,9
14	Cg1789	1541,74	LNCSWVVVGHSER	0,1	7,16	66,9	11,7	85,6	82,9	20,1	102,1
14	Cg1789	1639,88	GLIVELAGDEVAEGLR	0,51	3,68	98,4	8,5	106,9	122,9	26,4	154,9
15	Cg0048	1735,82	VIDGFMIQGGDPTGTGR	-0,12	3,88	57,2	7,4	69,1	72,5	9,6	87,3
15	Cg0048	1791,82	GGPGYTFADDFHPELR	-0,84	4,42	60,3	7,9	67,9	87,5	12	105,3
15	Cg0048	1846,93	YDRPADAVVIESVEITA	0,24	3,58	31,7	16,4	53	43,6	12,9	60,2
15	Cg0048	2210,02	GGPGYTFADDFHPELRFDR	-0,98	4,54	32,8	11	48,6	42,3	14	52,2
15	Cg0048	2784,41	GDITIDLFGNHAPETVANFVG LAQGTK	0,1	4,3	40,5	17,5	58,2	82,2	25	109,6
15	Cg0048	3060,56	VVDIAITATDRYDRPADAV VIESVEITA	0,3	3,68	17,9	5,1	22,8	24,9	9,9	37,6
16	Cg1630	1318,69	FLLDQPTTTAGR	-0,28	6,78	56,2	9,7	68,3	56,3	11,3	68,6
16	Cg1630	1646,79	NAQVMQTGDEIQIGK	-0,63	4,08	31,9	12,2	44,6	23,4	8,4	36,4
16	Cg1630	1728,83	HPESDIFLDDVTVSR	-0,41	3,96	65,9	8,3	78,7	88,3	9	102,2
16	Cg1630	1884,93	HPESDIFLDDVTVSR	-0,66	4,44	37,5	7,9	43,6	31,5	11,7	50,4
18	Cg0648	1424,78	LGIPHISTGDLFR	0,33	7,84	47,3	13,2	70,1	40,2	7,2	50,6
18	Cg0648	1806,88	LAESDAAEGFLLDGFPR	0,04	3,58	90,4	8,9	99,9	86,8	23,3	121,8
18	Cg1322	2061	SVTLDEVEGGVAEDPFGNTR	-0,09	3,58	70,6	15	88,4	71,3	17	101,3
18	Cg1322	2501,11	GEFTEYTDIVVDAENPENSS AK	-0,86	3,44	51,9	13,7	67,3	60,8	8,2	73,8
18	Cg1322	2756,28	VRGEFTEYTDIVVDAENPEN SSAK	-0,8	3,82	44,1	15,2	64,5	40,7	23,5	86,5
19	Cg2603	2372,09	GDFALTVGENVVHGS DSPES AER	-0,51	3,92	100,8	10,5	119,1	88,5	8,4	98,8
21	Cg2025	1500,79	LLDNPYEALNIAR	-0,15	4,08	67,8	6,5	76,8	63,1	5,9	69,3
21	Cg2025	2488,28	SNLPTEVYLSNQNQNETILAL K	-0,55	4,26	60,4	16,9	82,6	56,1	20,4	88
22	Cg2658	1262,66	RIDILADYER	-0,62	4,3	21,3	7,3	28,2	39,2	12,8	51,4
22	Cg0807	1798,85	SASNDEEKIQAFAFAR	-0,89	4,44	36,8	18,6	53,1	45,8	17,1	63,5
22	Cg2658	3376,41	AHGHEVIDCGAHTYDAEDDY PAFICIEASR	-0,44	4,16	47,5	23,4	69,2	34,4	16	54,5

9. Anhang

Spot	Acc. No.	Mr	Peptidsequenz	GRAVY	pI	MBA		ad MBA/EDA 0,5			
						Avg. Ion Score	SD	Max. Ion Score	Avg. Ion Score	SD	Max. Ion Score
24	Cg2280	1127,6	FLGFEQIFK	0,6	6,84	52,5	11	65	45,9	8,7	58,2
24	Cg2280	1253,62	EIGYLFQGHYR	-0,35	7,7	61,5	9,9	73,7	59,3	9,5	69,2
24	Cg2280	1647,81	VPWVDDQGGVHVNR	-0,81	5,1	74	8,2	82,9	57	22,2	78
24	Cg2280	2029,06	IVLEKDPHYADYGLIQR	-0,45	5,28	81,2	12,5	96,7	82	2,1	84,6
25	Cg2902	1228,64	HIVEWLYNR	-0,49	7,76	49,5	8,9	59,6	39,7	13,8	59,3
25	Cg2558	1349,71	TVQLAFHPYFK	0,11	9,52	36,8	7,7	44,9	38,2	8,9	47,6
25	Cg2902	1740,83	ISYIFNSQEDLDAAR	-0,38	3,7	71,5	20,6	95,9	73,5	10,7	80,3
25	Cg2558	2281,01	LNNEVETQDGPVTFDGEFDR	-1,1	3,38	58,8	8,9	70,4	57,1	14,4	77
26	Cg0690	1323,72	FGGVEYLLLSAR	0,78	6,88	64,9	14,7	90,1	61	4,5	69,8
26	Cg0690	1550,84	EKPQEATVIAGPGR	-0,47	7	82,1	12,9	95,1	85,2	12,6	98,8
26	Cg0690	1757,96	IPLDIKEDDVVIFSR	0,25	3,96	75,2	8,8	91,3	63,8	9	73,7
26	Cg0690	2369,27	ILVQINEAETTTASGLVIPDSA K	0,34	3,82	74,8	19,3	98,4	66,9	14,6	89,8
27	Cg3423	1172,66	VEEFVGLRPK	-0,24	7	36	4,2	42,1	31,1	12,7	46,4
27	Cg3423	1321,69	SNVAVTEQTFK	0,05	6,84	46,3	7	58	40,2	18	66,6
27	Cg3423	1632,82	LSPIIEEIIAGEYGDK	-0,22	3,68	58,9	6,8	72,1	51,2	21,3	79,7
28	Cg1790	2689,33	GIAQAIIIDATAGNDAFSVVG GDSAASVR	0,5	3,6	122,2	15,7	144	114,6	56,5	153,2
28	Cg1790	3357,64	YSLAPVAEALSDELQYVALA ADVVGEDAHER	0,07	3,68	96,3	24,8	136,1	106,8	24,1	125,1
29	Cg1437	1142,63	DSGVEVIGLR	0,71	4,08	38,7	6,7	44,4	45,7	10,3	60,7
29	Cg1437	1892,96	VAIVGYGSQGHASQNLNLR	-0,29	9,84	30,1	12,3	48,4	45,6	19,1	73,2
29	Cg1437	1975,03	AIELLYDADADLSLIQGR	0,28	3,5	113,8	16,9	134,8	97,8	5,6	105,7
29	Cg1437	2021,06	KVAIVGYGSQGHASQNLNLR	-0,48	10,14	41,9	7,2	52	35,8	8,3	44,2
29	Cg1437	3056,56	GVPCLIIVDQDPTGTALTL SYAAAIGGAR	0,53	3,88	104,7	29,9	133,1	116,3	14,9	133,7
30	Cg2782	1044,56	IAGDSGSGILR	0,35	6,78	21,9	3	25,7	27,3	6,1	35,9
30	Cg2782	1722,81	ELAAIQDAEKDYDSR	-1,19	3,84	43,6	5,8	51,5	78,4	23,6	107,3
30	Cg2782	2058,03	LDVTSIAIEAFEASLAHEQK	-0,03	4,16	30,8	8,9	44,5	74,8	26,5	117
32	Cg3100	1239,69	EAGQIAGLNVLNLR	0,34	6,98	39,3	17,8	53,9	65,2	16,8	86,5
32	Cg3100	1496,84	LLGSFELGGIAPAPR	0,61	6,98	70,6	11,6	86,1	85,7	12,6	109,2
32	Cg3100	1996,02	DAGVSVSEIDHVVLVGGSTR	0,43	4,3	66,1	10,4	74,1	88,7	21	111,7
32	Cg3100	2610,22	SETFTTAEDNQPSVQIQVFQ GER	-0,93	3,68	116,6	16,1	138,2	101	9,4	116,8
32	Cg3100	2873,32	DAEAYLGEDVTDVITVPAYF EDSQR	-0,32	3,28	104,9	10,3	114,9	125,7	5,7	133,4
32	Cg3100	3009,56	AVGIDLGTTSNVSVLEGGE PVIANAEGSR	0,46	3,68	72,1	10,6	87,7	65,9	22,8	91,9

Abb.9.1 Gelbild über den pH-Bereich 3-5,6 des cytosolischen *C. glutamicum*-Extrakts



Tab. 9.8 Proteinliste über den pH-Bereich 3-5,6 des cytosolischen *C. glutamicum*-Extrakts

Spot – Nummer des aus dem Gel ausgeschnittenen Bereichs; *Protein Summary Score* – gibt den *Mascot Score* für im PMF zugeordnete und fragmentierte Peptide zusammen an ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 47); *Peptide Summary Score* – *Mascot Score* aller fragmentierten Peptide eines Proteins ($p < 0,05$, Mascot-Signifikanzschwellenwert: 17); Acc. No CG – Nummer des Datenbankeintrags; Mr – molare Masse

Spot	Protein Summary Score	Peptide Summary Score	Acc.No. CG	Mr	identifiziertes Protein
1	453	155	2466	102819	Pyruvate Dehydrogenase E1 component
2	139	x	2662	96321	Aminopeptidase N
3	573	272	410	73823	Putative Prolyl-Endopeptidase
4	950	543	766	80146	Isocitrate Dehydrogenase
5	950	443	303	68430	2-Isopropylmalate Synthase
6	842	529	811	58303	Acetyl/Propionyl CoA Carboxylase, beta Subunit
7	1060	680	2429	53381	Glutamine Synthetase I
8	602	430	173	62503	Conserved hypothetical Protein
9	1170	751	3100	66247	Heat shock protein hsp70
10	535	214	1531	53998	30S Ribosomal protein S1
11	83	x	2419	54088	Leucine Aminopeptidase
12	552	297	3021	48666	Peptidase M20/M25/M40 family
13	795	546	2800	59228	Phosphoglucomutase
14	869	598	973	59130	Glucose-6-phosphate Isomerase
15	274	163	2705	49474	Maltose-binding Protein precursor
16	757	457	441	50848	Dihydrolipoamide Dehydrogenase
17	407	230	67	51970	Succinate-Semialdehyde Dehydrogenase (NADP+)
18	919	627	3201	47805	Seryl-tRNA Synthetase
19	659	411	1145	49847	Fumarate Hydratase
20	446	146	675	46439	Phosphoglucosamine Mutase
21	425	184	3131	47857	Acetylornithine Deacetylase or related Deacylase
22	244	87	1774	75220	Transketolase
23	756	443	294	46604	Aspartate Aminotransferase
24	831	492	2280	49357	NADP-specific Glutamate Dehydrogenase
25	789	475	1790	42785	Phosphoglycerate Kinase
26	430	224	755	46724	O-Acetylhomoserine (Thiol)-Lyase
27	199	95	984	56010	AICAR transformylase/IMP cyclohydrolase PurH
28	127	74	737	31779	ABC-type transport system, secreted Lipoprotein component
29	239	151	737	31779	ABC-type transport system, secreted lipoprotein component
30	148	48	1075	35813	Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthase Isozyme 2
31	199	162	1598	33845	Sugar Phosphatase of the HAD superfamily
32	413	284	2878	43746	Phosphoribosylamine-glycine Ligase
33	831	626	1437	36250	Ketol-Acid Reductoisomerase
34	452	284	2781	38032	Ribonucleoside-diphosphate Reductase 2 beta chain
35	351	201	2418	41836	Branched-chain amino acid Aminotransferase
36	771	380	2536	41047	Cystathionine beta-Lyase
37	365	225	1531	53998	30S ribosomal Protein S1
38	345	182	700	39860	IMP Dehydrogenase / GMP Reductase C terminus
39	209	72	3068	37362	Fructose-bisphosphate Aldolase

Spot	Protein Summary Score	Peptide Summary Score	Acc.No. CG	Mr	identifiziertes Protein
40	225	121	3079	93174	probable ATP-dependent Protease (HSP)
41	287	70	2280	49357	NADP-specific Glutamate Dehydrogenase
42	x				
43	x				
44	809	500	3068	37362	Fructose-bisphosphate Aldolase
45	934	586	3068	37362	Fructose-bisphosphate Aldolase
46	984	666	1791	36194	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
47	607	386	2466	102819	Pyruvate Dehydrogenase E1 component
48	774	470	2792	30408	NAD-Synthetase
49	692	538	2613	34887	Malate Dehydrogenase Oxidoreductase protein
50	970	591	2833	32768	O-Acetylserine (Thiol)-Lyase
51	587	428	2163	26065	Dihydropicolinate Reductase
52	459	246	2874	33255	Phosphoribosylaminoimidazole-Succinocarboamide Synthase
53	488	242	703	56237	putative GMP Synthase
54	160	104	2137	31819	Glutamate secreted binding Protein
55	364	204	2222	30157	30S ribosomal Protein S2
56	93	62	1872	27074	conserved hypothetical Protein
57	167	98	910	27933	Inositol Monophosphatase
58	647	380	803	33530	Thiosulfate Sulfurtransferase
59	402	159	803	33530	Thiosulfate Sulfurtransferase
60	282	141	564	25031	50S ribosomal Protein L1
61	192	116	2117	59972	Phosphoenolpyruvate-protein Kinase
62	443	245	2117	59972	Phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system Enzymei
63	575	353	482	27286	Phosphoglyceromutase 1
65	525	283	3036	29757	Exodeoxyribonuclease III
66	188	65	2591	33675	2,5-Diketo-D-gluconic acid reductase
67	386	159	1698	30268	ATP Phosphoribosyltransferase
68	x				
69	348	101	3079	93174	probable ATP-dependent Protease (HSP)
70	251	50	3079	93174	probable ATP-dependent Protease (HSP)
71	166	70	1409	37236	6-Phosphofructokinase
72	112	45	2538	35653	Alkanal Monooxygenase alpha chain
73	190	84	131	33981	Putative Oxidoreductase
74	x				
74	319	153	3350	30596	2-Keto-4-pentenoate Hydratase/2-Oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid Hydratase
75	277	173	3364	29114	Tryptophan Synthase alpha Chain
76	519	298	2661	22846	putative Dithiol-disulfide Isomerase
77	518	305	2888	26334	putative two component response regulator
78	222	39	2558	27609	related to Aldose 1-Epimerase
79	503	351	3100	66247	Heat shock protein HSP 70
80	798	570	3100	66247	Heat shock protein HSP 70
81	285	230	1801	23912	Ribulose-5-phosphate-3-Epimerase
82	350	245	1790	42785	Phosphoglycerate Kinase
83	460	257	2734	20338	Nicotinamidase/Pyrazinamidase
84	237	72	871	18459	conserved hypothetical Protein
85	189	106	1645	21161	SAM-dependent Methyltransferase

9. Anhang

Spot	Protein Summary Score	Peptide Summary Score	Acc.No. CG	Mr	identifiziertes Protein
86	193	88	2958	27047	L-2,3-Butanediol Dehydrogenase/Acetoin reductase
87	x	19	2361	38662	Cell division initiation Protein - Antigen 84 homolog
88	92	64	1381	82712	1,4-alpha-Glucan branching Enzyme
89	62	x	131	33981	Putative Oxidoreductase
90	183	141	3096	55243	Aldehyd Dehydrogenase
91	158	77	1423	39693	putative Oxidoreductase (related to Aryl-alcohol Dehydrogenases)
92	151	38	2361	38662	Cell division initiation protein - Antigen 84 homolog
93	146	59	1559	21952	Zn-dependent Hydrolase
94	57	x	335	16625	conserved hypothetical protein, GatB/Yqey domain
95	374	258	2217	20736	Ribosome recycling Factor
96	474	621	3237	22088	Manganese superoxide Dismutase
97	155	37	154	22700	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolase
98	332	195	2645	21251	ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE PROTEOLYTIC SUBUNIT CLPP1
99	393	246	2708	40347	ABC-type sugar transport System, ATPase component
100	559	352	3050	20217	Acyltransferase
101	164	94	650	26451	secreted Protein
102	442	343	1718	18978	Phospholipid-binding Protein
103	180	133	2464	15474	conserved hypothetical Protein
104	265	160	1236	17967	Thiol Peroxidase
105	231	148	1236	17967	Thiol Peroxidase
106	256	147	1123	18803	Transcription elongation Factor
107	96	88	1895	19082	putative secreted Protein
108	493	287	1630	15393	putative Signal transduction Protein, FHA domain
109	392	212	3327	18344	Starvation-induced DNA protecting Protein
110	532	315	648	19415	Adenykate Kinase
111	571	344	2692	17581	predicted Thioesterase
112	53	29	306	44955	Aspartokinase LYSC alpha & beta subunits
113	353	180	582	17527	30S ribosomal Protein S7
114	59	27	704	15785	conserved hypothetical Protein
115	308	147	870	14506	Haloacid Dehalogenase/Epoxide Hydrolase family
116	71	62	1224	14816	Similarity to Alkylphosphonate uptake operon Protein phnB - Escherichia coli
117	90	26	1811	11860	putative Integration host Factor cIHF
118	80	33	1044	12719	conserved hypothetical Protein
119	x				
120	56	x	1073	16029	predicted Lactoylglutathione Lyase
121	118	60	3068	37362	Fructose-bisphosphate Aldolase
122	98	54	2974	59061	Lysyl-tRNA Synthetase
123	364	262	2431	14515	putative transcriptional Regulator
124	252	79	2794	15761	conserved hypothetical Protein
125	193	128	2962	11037	uncharacterized Enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides
126	96	21	2880	15142	HIT family Hydrolase
127	245	112	2155	10601	conserved hypothetical Protein
128	272	230	371	7286	Cold-shock Protein CSPA
129	133	70	2962	11037	uncharacterized Enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides
130	224	150	2903	15378	hypothetical Protein predicted by Glimmer
131	58	46	10	15188	conserved hypothetical Protein

Spot	Protein Summary Score	Peptide Summary Score	Acc.No. CG	Mr	identifiziertes Protein
132	x				
133	x				
134	x				
135	86	20	882	7952	conserved hypothetical Protein
136	125	56	2865	8739	Phosphoribosylformylglycinamide Synthase component
137	144	77	963	10142	hypothetical Protein
138	261	100	3315	17958	Bacterial regulatory Protein, MarR family
139	60	x	2658	17148	possible Phosphopentose Isomerase
140	229	163	2025	11257	hypothetical Protein predicted by Glimmer
141	63	x	1373	16903	Glyoxalase/Bleomycin resistance/Dioxygenase superfamily Protein
142	154	44	3237	22088	Manganese superoxide Dismutase
143	x				
144	165	68	228	16294	Sensor Histidine Kinase of two-component system-fragment
145	1030	701	1791	36194	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
146	650	508	3237	22088	Manganese superoxide Dismutase
147	754	436	1737	102504	Aconitase
148	242	87	1630	15393	putative Signal transduction Protein, FHA domain
149	62	55	3318	11388	uncharacterized Enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides
150	110	36	3299	13561	Thioredoxin
151	650	350	1774	75220	Transketolase
152	437	333	2181	57710	ABC-type peptide Transport system, secreted component
153	473	391	2846	38935	ABC-type phosphate transport System, secreted component
154	154	112	2603	14791	Nucleoside diphosphate Kinase
155	488	334	2902	29633	Predicted Hydrolases of the HAD superfamily
156	908	640	1111	44978	Enolase
157	119	52	2782	18055	Ferritin-like Protein
158	516	229	2840	54540	Butyryl-CoA:acetate coenzyme A Transferase
159	524	261	3219	34498	L-lactate Dehydrogenase
160	x				
161	421	244	48	18486	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase B
162	125	41	2988	17894	inorganic Pyrophosphatase
163	229	114	2658	17148	possible Phosphopentose Isomerase
164	x				
165	188	51	2891	62368	Pyruvate Dehydrogenase
166	872	382	310	58730	Catalase
167	784	505	1789	27357	Triosephosphate Isomerase
168	689	400	1776	38362	Transaldolase
169	302	113	3423	11932	Thioredoxin
170	650	446	2613	34887	Malate Dehydrogenase Oxidoreductase Protein
171	160	87	690	10763	Chaperonin 10 Kd subunit
172	481	218	948	40135	Phosphoserine Transaminase
173	383	189	2900	35348	Meso-Diaminopimelate Dehydrogenase
174	537	252	1826	38967	XAA-PRO Aminopeptidase
175	550	285	482	27286	Phosphoglyceromutase 1
176	304	193	2685	25329	putative short-chain Dehydrogenase Reductase

10. Publikationsliste

10.1 Publikationen in Fachzeitschriften

Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics.

Rietschel B, Arrey TN, Meyer B, Bornemann S, Schuerken M, Karas M, Poetsch A: *Mol Cell Proteomics* **2009**, 8(5), 1029-1043

The benefit of combining nLC-MALDI-Orbitrap MS data with nLC-MALDI-TOF/TOF data for proteomic analyses employing elastase.

Rietschel B, Baeumlisberger D, Arrey TN, Bornemann S, Rohmer M, Schuerken M, Karas M, Meyer B: *J Proteome Res* **2009**, 8(11), 5317-5324

Membrane protein analysis using an improved peptic in-solution digestion protocol.

Rietschel B, Bornemann S, Arrey TN, Baeumlisberger D, Karas M, Meyer B: *Proteomics* **2009**, 9(24), 5553-5557

A novel polyacrylamide gel system for proteomic use offering controllable pore expansion by crosslinker cleavage.

Bornemann S, Rietschel B, Baltruschat S, Karas M, Meyer B: *Electrophoresis* **2010**, 31(4), 585-592

Approaching the Complexity of Elastase-Digested Membrane Proteomes Using Off-Gel IEF/nLC-MALDI-MS/MS.

Arrey TN, Rietschel B, Papasotiriou DG, Bornemann S, Baeumlisberger D, Karas M, Meyer B: *Anal Chem.* **2010**, 82(5), 2145-2149

10.2 Posterpräsentationen

A new polyacrylamide gel system based on an alternative crosslinker for proteomic research

Bornemann S, Karas M: 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 02. – 05. März 2008, Gießen

A new polyacrylamide gel system based on an alternative crosslinker for proteomic research

Bornemann S, Karas M: 56. ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 01. – 05. Juni 2008, Denver CO

Analysis of membrane complex „NADH:Ubiquinone oxidoreductase“ of *Aquifex aeolicus*.

Bornemann S, Peng G, Hedderich T, Michel H, Karas M: 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 08. – 11. März 2009, Konstanz

Lebenslauf

11.1 Persönliche Angaben

Name: Sandra Bornemann

Geburtsdatum: 31.10.1979

Geburtsort: Frankfurt am Main

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig

11.2 Schulbildung

1986 – 1990 Kerschensteiner Schule, Frankfurt am Main

1990 – 1999 Bettinaschule, Frankfurt am Main

06/09 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

11.3 Hochschulbildung

10/99 – 10/03 Studium der Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt am Main

11/04 Approbation als Apothekerin

11.4 Promotionsstudium

Seit 01/05 Anfertigung einer Dissertation am Institut für pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität, Frankfurt unter Leitung von Prof. M. Karas

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders danke ich Prof. Dr. Michael Karas für die interessante Themenstellung und die damit verbundene freie Gestaltung meiner Arbeit, für die exzellenten Arbeitsbedingungen während meiner Promotion sowie der Möglichkeit zur Teilnahme an vielen nationalen und internationalen Kongressen.

Herrn Prof. Hermann Schägger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Ute Bahr für ihre stete Hilfsbereitschaft und an Dr. Björn Meyer für die thematische Vorlage zu meiner Dissertation.

Ich danke Walter Eckhard für die netten Gespräche und seine Hilfe beim Kampf gegen die organisatorischen Dinge des Unialltags.

Meinen ehemaligen und jetzigen Laborkollegen Dr. Marianne André, Anne Arnold, Tabiwang Arrey, Dominic Bäumlisberger, Dr. Carsten Corvey, Frank Dannenberg, Jeremy Hack, Dr. Sandra Hack, Dr. Martin Hampel, Daniel Hierl, Dr. Tri Hoang, Dr. Corina Hunger, Thorsten Jaskolla, Stavroula Markoutsas, Benjamin Müller, Andreas Münch, Dimitrios Papasotiriou, Markus Persike, Dr. Isam Rais, Marion Rohmer, Dr. Thomas Russ, Dr. Eric Schulz, Malte Schürken, Dr. Sieglinde Überall, Dorota Urbanek und Dr. Markus Weidlich danke ich für die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre während meiner Zeit im Arbeitskreis.

Ich werde die vielen schönen Momente mit euch gerne in Erinnerung behalten.

Besonderer Dank gilt meinem besten Bürokollegen Tobias Beckhaus. Seine kritischen Anmerkungen, lustigen Anekdoten und seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft (nicht nur in wissenschaftlichen Fragen) haben ihn in dieser Zeit unentbehrlich werden lassen.

Meiner Freundin und Wegbegleiterin Dr. Sabrina Baltruschat danke ich für die gemeinsamen Jahre und ihr immer offenes Ohr. Ohne dich wäre die Zeit in diesem Arbeitskreis nicht das Gleiche gewesen.

Ich danke meiner Freundin Cornelia Riemann, deren aufbauende Worte mir immer ein starker Rückhalt waren.

Meinem väterlichen Freund und Sponsor Hardy Michalczyk sei hier besonders gedankt. Er wäre so gerne bei meiner Disputation dabei gewesen.

Meinen Eltern danke ich für ihr Vertrauen und dass sie mich immer auf meinem Weg unterstützt haben.

Mein spezieller Dank gilt Benny, der mich besonders in den letzten beiden Jahren auf jegliche Weise unterstützt hat. Seine Zusprache und sein Glaube an mich haben vieles leichter gemacht.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die „Etablierung eines neuen Polyacrylamid-Gelsystems zur verbesserten massenspektrometrischen Analyse von Proteinen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften, mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt, den 03. April 2010



Sandra Bornemann